1930

THESIS

AMSTERDAM

UNIVERSITY LIBRARY
JAN
2
1931
STANFORD

E. L. KRUGERS DAGNEAUX

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER ATYPISCHE COLIBACTERIËN

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

3789
A52K
UNCLASSED
Dissertation

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/bijdragetotdeken0000elkr

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER ATYPISCHE COLIBACTERIËN

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER ATYPISCHE COLIBACTERIËN

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS DR. D. VAN EMBDEN, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER RECHTSGELEERDHEID IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN IN DE AULA DER UNIVERSITEIT, OP VRIJDAG 30 MEI 1930 DES NAMIDDAGS TE 4 UUR DOOR

EMIL LEONARD KRUGERS DAGNEAUX
GEBOREN TE ROERMOND

J. MUUSSES
PURMEREND — MCMXXX

AAN MIJN OUDERS.

Zeer gaarne grijp ik de gelegenheid van het verschijnen van mijn proefschrift aan, om U, Hoogleeraren, Lectoren en Privaat-Docenten aan de Universiteit van Amsterdam mijn welgemeenden dank te betuigen voor het onderwijs, wat ik van U mocht ontvangen.

Zeergeleerde WUITE en HEINSIUS, mijn dank voor de wijze, waarop Gij mij de eerste beginselen der scheikunde en der microbiologie hebt eigen doen maken.

Hooggeleerde DUBOIS, STOMPS en PANNEKOEK, Zeergeleerde BÜCHNER, ik dank U voor Uwe leiding, gedurende mijn eerste studiejaren.

Met weemoed gedenk ik U, Hooggeleerde VERSCHAFFELT en SISSINGH, hoe gaarne had ik ook U dit boekje overhandigd.

Hooggeleerde SMITS en ATEN, Hooggeachte VAN ITALLIE, U dank ik voor het vele, wat ik op Uwe colleges en practica geleerd heb.

Hooggeleerde HONDIUS BOLDINGH, mijn dank voor den steun, die ik steeds van U mocht ontvangen en Uwe prettige leiding bij de zoo leerzame excursie's in het binnen- en buitenland.

Hooggeleerde WIBAUT, zeer veel dank ben ik U verschuldigd. Gedurende mijne geheele chemische studie hebt Gij mij steeds met raad en daad bijgestaan; hoe zeer spijt het mij, dat Gij door een betreurenswaardig ongeval bij mijn promotie niet aanwezig zult kunnen zijn.

Hooggeleerde VAN LOGHEM, Hooggeschatte Promotor, ik dank U voor de gelegenheid, die Gij mij geboden hebt, om in Uw laboratorium mijn proefschrift te bewerken. De groote welwillendheid, die ik gedurende deze jaren steeds van U heb mogen ondervinden, zal steeds in dankbare herinnering bij mij voortleven.

Met bijzondere gevoelens van dankbaarheid richt ik mij tot U, Zeergeleerde SMIT. Uwe voortdurende belangstelling bij de bewerking van mijn proefschrift is mij steeds een groote steun ge-

weest. Moge Uwe buitengewone werkzaamheid en nauwgezetheid mij steeds tot voorbeeld strekken.

Waarde LOUWE KOOYMANS, mijn dank voor onze „vriendschappelike" samenwerking en de vele opmerkingen, die mij vaak van groot nut zijn geweest.

Ten slotte nog een woord van dank aan allen, die op eenigerlei wijze aan het tot stand komen van dit proefschrift hebben medegewerkt, in het bijzonder aan het personeel van het Laboratorium voor de Gezondheidsleer.

INHOUD.

INLEIDING 1

HOOFDSTUK I - OVERZICHT DER ATYPISCHE COLIBACTERIËN 4
§ 1. *Eigenschappen van Bacterium coli commune* . . 4
§ 2. *Lactose-vergistende stammen* 5
§ 3. *Lactose-niet-vergistende stammen* 13
§ 4. *Indeeling van het onderzoek* 16

HOOFDSTUK II - ISOLEERING DER ONDERZOCHTE STAMMEN 18
§ 1. *Uit water* 18
§ 2. *Uit faeces* 19
§ 3. *Uit urine* 20
§ 4. *Uit excrementen van koudbloedige dieren* . . . 20

HOOFDSTUK III - EIGENSCHAPPEN DER GEÏSOLEERDE STAMMEN 25
§ 1. *Inleiding* 25
§ 2. *Gelatine vervloeiing* 25
§ 3. *Melkcoagulatie* 26
§ 4. *Lakmoeswei* 26
§ 5. *Indolvorming* 27
§ 6. *V.P. en M.R. reactie* 28
§ 7. *Citraatproef* 29
§ 8. *Aesculine splitsing* 30
§ 9. *Haemolyse en haemodigestie* 32
§ 10. *Koolhydraten, enz.* 33
§ 11. *Voedingsbodem volgens Endo* 39
§ 12. *Overzicht* 41

HOOFDSTUK IV - STOFWISSELING 42
§ 1. *Inleiding* 42
§ 2. *Gebruikte analysemethoden* 45
§ 3. *Vergisting der glucose door bacteriën der Ie groep* 49

§ 4. *Vergisting der glucose door bacteriën der IIe groep* 50
§ 5. *Vergisting der glucose door bacteriën der IIIe en IVe groep*. 51
§ 6. *Vergisting der lactose door bacteriën der Ie groep* 52
§ 7. *Vergisting der lactose door bacteriën der IIe groep* 53
§ 8. *Vergisting der lactose door bacteriën der IIIe groep* 54
§ 9. *Vergisting der lactose door bacteriën der IVe groep* 55
§ 10. *Overzicht* 56

HOOFDSTUK V - VARIABILITEIT 57
§ 1. *Inleiding* 57
§ 2. *Verlies van eigenschappen*. 57
§ 3. *Winst van eigenschappen* 59
§ 4. *Adaptatievormen* 62
§ 5. *Over de verandering der eigenschappen bij het langdurig bewaren in steriel leidingwater* 65

HOOFDSTUK VI - HET AFSTERVEN VAN ATYPISCHE COLIBACTERIËN IN STERIEL WATER. 69
§ 1. *Inleiding* 69
§ 2. *Wijze van onderzoek* 69
§ 3. *Bacteriën der Ie groep* 71
§ 4. *Bacteriën der IIe groep*. 72
§ 5. *Bacteriën der IIIe groep* 74
§ 6. *Bacteriën der IVe groep* 74
§ 7. *Titers in glucose-, lactosebouillon en Eijkmansche vloeistof*. 76
§ 8. *Overzicht* 76
§ 9. *Afsterving van mengsels van bacteriën* 78
§ 10. *Verschil der bouillonagar- en Endoagartiter* . . 83
§ 11. *Proeven met steriel leidingwater* 89

SLOTBESCHOUWING 90
LITTERATUUR 95

INLEIDING.

Het bacteriologisch drinkwateronderzoek, als onderdeel van de hygienische contrôle van een watervang of waterleidingbedrijf, wordt in de laatste decenniën steeds meer samengetrokken in het onderzoek naar het voorkomen van Bacterium coli, en wel naar die vertegenwoordigers der groote coligroep, waaraan men een z.g. faecalen oorsprong meent te mogen toeschrijven. Dit geschiedt dan op grond van de overweging, dat slechts deze soorten en niet de colibacteriën, die in de onbesmette natuur voorkomen, de indicatoren zijn eener mogelijke besmetting met pathogene kiemen van ziekten als typhus en cholera, die in den darm der zieken voorkomend, steeds door een groot aantal dezer colibacteriën vergezeld, worden uitgescheiden en de watervang kunnen hebben besmet. Ten einde zeker te zijn van de voortdurende afwezigheid der pathogene kiemen, heeft men de strengere eisch ingevoerd, dat ook de op zich zelf onschuldige colibacteriën van faecalen oorsprong onder alle omstandigheden moeten ontbreken in een hoeveelheid water, die door de meeste onderzoekers op 50 of 100 cc. gesteld wordt. Het spreekt van zelf, dat ook aesthetische overwegingen tot het stellen van bovengenoemden eisch hebben medegewerkt en dat deze voor sommigen de aanleiding zijn geworden, om elke colibacterie van faecalen oorsprong te weren uit het door hen geschikt geacht drinkwater.

Aan dit onderzoek naar het faecale of typische B. coli en de op grond daarvan op te stellen bacteriologische beoordeeling van het water wordt nu aan drie zijden een hinderpaal in den weg gezet. Want ten eerste valt een volkomen scherp en onaanvechtbaar beeld van deze bacterie niet te geven, omdat het in een groot aantal varieteiten blijkt voor te komen, allen min of meer afwijkend van wat men als standaard type heeft leeren beschouwen en welker rol als indicator eener faecale verontreiniging men niet kent. Daartoe behooren b.v. de soorten, die een

enkele eigenschap hebben gewonnen of verloren, zooals de vergisting van saccharose of de vorming van indol en vele dergelijke. Ze hebben echter nog een groot aantal grondkenmerken gemeen, zooals de morphologische en hun gistend vermogen t.o.v. glucose en lactose, zoodat men ze meestal maar onder de òngewenschte colibacteriën rangschikt.

Ten tweede blijkt de uitslag der coliproeven afhankelijk van de gebruikte cultuurvloeistof. Is het bijv. soms onmogelijk om uit een watermonster „echte" colibacteriën te kweeken met behulp van de vloeistof van Eijkman bij 45° C., dan gelukt het dikwijls nog wel om ze te vinden met de galvloeistof van McConkey bij 37° of een andere, als zeer „scherp" aanbevolen proef. Over de beste wijze van kweeken verschilt men natuurlijk van meening, waaronder de juiste waardebepaling der coliproef in belangrijke mate te lijden heeft. Men wil het meestal doen voorkomen of het mislukken van een bepaalde kweekmethode daaraan te wijten zou zijn, dat deze niet in staat is om de in het water voorkomende „verzwakte" exemplaren van B. coli tot groei te brengen en prijst daarom een andere vloeistof aan, die dat onder de zelfde omstandigheden wel kan.

In de derde plaats heeft men een groote groep van coliachtige organismen ontdekt, die zich op meer fundamenteele punten van het standaardtype onderscheiden, bijv. door het gemis van het vermogen om de lactose te vergisten en die dààrom niet uit onze belangstelling mogen worden losgelaten, omdat ze in menschelijke en dierlijke faeces voorkomen en men dus niet weet, of ook aan hen geen beteekenis als indicator eener faecale infectie moet worden toegekend. Zoolang in het water naast deze nog typische soorten worden gevonden, is hun rol van geen belang, omdat men zijn oordeel kan gronden op de aanwezigheid dezer laatsten, maar het komt ook herhaaldelijk voor, en vooral Clemesha's werk in Britsch-Indië heeft dat duidelijk gemaakt, dat in oorspronkelijk besmet, maar daarna langdurig bewaard water slechts atypische soorten worden gevonden, over welker beteekenis men min of meer in twijfel verkeert, indien men ook resten eener faecale verontreiniging wil uitsluiten. Is men daarentegen in dit opzicht iets toegevender, dan doet zich de vraag voor, in hoeverre een vroegere besmetting door de bij het bewaren werk-

zame reinigende krachten moet zijn verwijderd, om het water als ongevaarlijk drinkwater te beschouwen en welke rol de overgebleven atypische soorten in de vorming van ons oordeel spelen.

Ik heb mij daarom tot taak gesteld, om nadere gegevens te verkrijgen over deze, in water en faeces voorkomende atypische soorten en vooral om hun gedrag in water na te gaan op de wijze als door Jongbloed voor typische colibacteriën is geschied, in de hoop, dat een vergelijking met deze laatste ons iets verder zou brengen in de kennis van de verschijnselen, die zich bij de zelfreiniging van water afspelen. Daartoe moest allereerst een overzicht verkregen worden over de reeds bekende atypische soorten, waarna eigen studie van een aantal vertegenwoordigers van verschillende herkomst noodzakelijk zou zijn, gedeeltelijk parallel met Jongbloed's onderzoek, tot het verkrijgen van belangrijk vergelijkingsmateriaal.

HOOFDSTUK I.

Overzicht der Atypische Colibacterien.

§ 1 — **Eigenschappen van Bacterium coli commune.**

Indien men zich kan vereenigen met de opvatting, dat aan het B. coli commune in den meest stricten zin de eigenschappen moeten worden toegekend, die in onderstaande tabel vereenigd zijn, dan moet dus elke van één cel afkomstige reincultuur, die daarvan op een of meer punten afwijkt, tot de atypische colibacteriën worden gerekend en nader onderzoek van een groot aantal stammen leert, dat het zoo te bepalen aantal atypische soorten zeer groot is en stijgt met elke eigenschap, waarmee men bovenstaande tabel zou willen uitbreiden. Want de practijk leert, dat er steeds wel een stam te vinden is, die deze eigenschap niet bezit.

Tabel 1.

Eigenschappen van B. coli commune.

micr. beeld	plompe staafjes
Gramkleuring	negatief
sporenvorming	afwezig
beweeglijkheid	positief
gelatinevervloeiing	afw.
gedrag tov. zuurstof	facult. anaeroob
bipolaire kleuring	afw.
pigmentvorming	afw.
groei op Endoplaten	rood met metaalglans
vorming van indol	pos.
vorming van gas en zuur uit glucose (37°)	pos.
id. uit lactose	pos.
vergisting van saccharose	neg.
proef van Eijkman (45°)	pos.
methylroodproef	pos. (rood)

proef van Voges en Proskauer . . . . . neg.
reductie van neutraalrood . . . . . pos.
stremming van melk . . . . . pos.
groei in Koser's citraatvloeistof . . . . . neg.
id. in urinezuurvloeistof (Koser) . . . . . neg.

Men wordt door deze feiten genoopt tot een, ook overigens zeer nuttige beperking, die des te meer vóór de hand ligt, omdat de in de litteratuur beschreven atypische soorten eveneens door een betrekkelijk gering aantal kenmerken zijn gekarakteriseerd, waaronder, behalve de vrijwel vaststaande kenmerken (morphologische eigenschappen, de afwezigheid van gelatinevervloeiing in 7 dagen, het gedrag ten opzichte van zuurstof, vergisting der glucose) de eigenschap van de vergisting der lactose de belangrijkste rol speelt.

Over deze eigenschap der colibacteriën is reeds veel geschreven. De meesten hebben haar als een vaststaand kenmerk van B. coli beschouwd en hebben dan ook het zoeken naar deze bacterie in drinkwater volgens deze opvatting ingericht: men gebruikt een of andere lactose-houdende voedingsvloeistof, tracht met het te onderzoeken water daarin gisting te verwekken en daarna B. coli te isoleeren (Codex alimentarius, Amerikaansche codex, de Graaff (43)). Als logisch gevolg worden dan alle coli-achtigen, die de lactose niet vergisten kunnen, als atypisch beschouwd.

Aanvaardt men deze eigenschap als grondslag voor verdeeling der geheele coligroep, dan kan men dadelijk de atypische soorten in twee groote groepen verdeelen, n.l. de lactose-vergistende, doch op andere punten afwijkende, en de lactose-niet-vergistende soorten, onverschillig, welke hunne overige kenmerken zijn, mits de morphologische gegevens hunne toelating in de coligroep wettigen.

We zullen de reeds bekende gegevens van beide groepen kort bespreken.

§ 2 — Lactose vergistende stammen.

Reeds door vele onderzoekers is nagegaan, welk belang deze stammen voor het drinkwater onderzoek zouden kunnen hebben. Een der eerste vragen, die men zich stelde was, of ook deze atypische soorten darmbacteriën waren en of men aan de in het water

algemeen voorkomende colibacteriën bepaalde, kenmerkende eigenschappen kon toekennen, ter onderscheiding van faecale of pathogene colisoorten; of het dus mogelijk was om van bepaalde „watercoli" te spreken. Reeds een vluchtig overzicht van de litteratuur bewijst, dat dit onmogelijk bleek. CLEMESHA (21), MAC CONKEY (80), e.a. konden tientallen, volgens hen goed gedefinieerde, atypische colibacteriën aantoonen, zonder evenwel met zekerheid den oorsprong ooit te kunnen aangeven. Overzien we de voornaamste pogingen ter classificatie nader, dan blijkt, dat geen enkele verdeeling het beoogde doel bereikt heeft en zij hebben alleen waarde, om eenige orde in de groote coligroep te scheppen.

Een korte bespreking der voornaamste classificatie's volgt hier:

McConkey 1905.

In 1905 publiceerde MCCONKEY (79) zijn uitvoerige onderzoekingen over „Lactose fermenting bacteria in faeces" in verband met het drinkwateronderzoek.

De faeces was zoowel van menschelijken als dierlijken oorsprong en McConkey komt tot het resultaat, dat beider coliflora identiek is.

Hij onderscheidt vier groepen tov. saccharose en dulcitol:

groep	sacch.	dulc.	type:
I	—	—	B. acidi lactici, Hüppe.
II	—	++	B. coli commune, Escherich.
III	++	++	B. neapolitanus, Emmerich. B. pneumoniae, Friedländer.
IV	++	—	

groep IV wordt onderverdeeld in 4 subgroepen:

subgr.	gelatine	V.P.	type:
1	—	—	B. coscoroba.
2	—	+	B. lactis aerogenes.
3	+	+	B. cloacae.
4	+		? (vormt geel pigment).

McConkey 1909.

Vier jaar later geeft McConkey (80) een nieuw overzicht. Hij gaat weer uit van zijn 4 hoofdgroepen, doch onderscheidt in iedere groep 32 variëteiten. Als variabelen voegt hij toe: gelatine-vervloeiing, bewegelijkheid, indolvorming, de reactie van Voges en Proskauer en het gedrag tov. adonitol, inuline en inositol. Hij beschrijft 32 vormen en heeft aan een klein aantal namen gegeven, die het beste aansluiten bij de gegeven beschrijving van bepaalde soorten. Clemesha en vele anderen hebben deze tabel gebruikt en aangevuld en tot heden heeft deze verdeeling der lactose vergistende vormen zich weten te handhaven (o.a. Holwerda (59)). (Zie tabel 2).

Levine 1917.

Levine (72) onderscheidt slechts 7 typen, behoorende tot 2 sectie's:

Coli Sectie: V.P. —; M.R. +; $CO_2/H_2 = 1$; urinezuur —.
sacch. — ; salicine ++: B. coli.
salicine — : B. acidi lactici.
sacch. ++; beweg. + : B. communior.
beweg. —
sal. ++: B. neapolitanum.
sal. — : B. coscoroba.

Aerogenes Sectie: V.P. +; M.R. —; $CO_2/H_2 > 2$; urine-zuur +.
glycerol ++; zetmeel ++; onbew.; gelatine —: B. aerogenes.
„ — ; „ — ; beweg.; „ +: B. cloacae.

Voor deze verdeeling heeft Levine uitgebreide correlatie-tabellen gemaakt. In tegenstelling met McConkey en ook met Jackson geeft Levine aan salicine de voorkeur boven dulcitol. Nu gaat helaas het vermogen om deze beide koolhydraten te vergisten heelemaal niet samen. Zelf geeft hij voor 89 saccharose-negatieve colistammen dit tabelletje:

	sal. +	sal. —
dulc. +	28	5
dulc. —	23	33

Tabel 2.

varieteit-nummer:	naam:	Saccharose	Dulcitol	Adonitol	Inuline	Voges-Pr.	Indol	Bewegelijkh.	Gelatine
1		—	—	+	—	—	+	+	—
2	B. accidi lactici (Hüppe).	—	—	+	—	—	+	—	—
3	B. levans.	—	—	—	+	+	—	+	+
4	B. grünthal, castellus, etc.	—	—	—	—	—	+	+	—
5	B. vesiculosus	—	—	—	—	—	+	—	—
6		—	—	—	—	+	+	—	—
7		—	—	—	—	—	—	+	—
8	B. coli mutabilis (Massini). . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
33		—	+	+	—	—	+	+	—
34	B. coli communis, cavicidae . . .	—	+	—	—	—	+	+	—
35	B. schäfferi	—	+	—	—	—	+	—	—
36		—	+	—	—	—	—	+	+
65	B. oxytocus perniciosus	+	+	+	+	+	+	—	+
66		+	+	+	—	—	+	—	—
67		+	+	+	—	+	—	—	—
68	B. pneumoniae, rhinoscleroma . .	+	+	+	—	—	—	—	—
69		+	+	—	+	+	—	+	+
70		+	+	—	—	—	—	+	+
71		+	+	—	—	—	+	+	—
72	B. neapolitanus	+	+	—	—	—	+	—	—
73		+	+	—	—	+	—	+	+
74		+	+	—	—	—	—	+	—
75		+	+	—	—	+	—	—	—
97		+	—	+	+	+	+	—	+
98		+	—	+	+	+	—	—	—
99		+	—	+	+	—	—	—	—
100		+	—	+	—	—	+	+	—
101		+	—	+	—	—	+	—	—
102		+	—	+	—	+	—	+	+[1]
103	B. lactis aerogenes, capsulatus, etc.	+	—	+	—	+	—	—	—
104	B. gasiformans non-liquefaciens . .	+	—	+	—	±[2]	—	—	—
105		+	—	—	+	+	—	+	+
106		+	—	—	—	—	+	+	—
107	B. coscoroba	+	—	—	—	—	+	—	—
108	B. cloacae	+	—	—	—	+	—	+	+
109		+	—	—	—	—	—	+	—

Tabel van McConkey voor lactose-vergistende bacteriën.
In de oorspronkelijke tabel is ook het gedrag ten opzichte van inositol, {cyclo-hexaan-hexol, $C_6H_6(OH)_6$}, aangegeven.

---

[1]) volgens Clemesha —.
[2]) „ „ +.

KLIGLER (63) had in 1914 ook al op salicine gewezen ter onderscheiding. Een groot voordeel boven dulcitol mag verder het enorme prijsverschil gelden. (1 gr. salicine fl. 0.008, 1 gr. dulcitol fl. 7.50).

De onderscheiding der saccharose-vergistende stammen in bewegelijke en onbewegelijke kan ik niet toejuichen.

Bij de aerogenes sectie zullen we door de vele voorwaarden, waaraan de 2 soorten moeten voldoen, steeds vele afwijkingen vinden. Wil een classificatie systeem voldoen, dan zal steeds maar één differentiatie kenmerk in aanmerking mogen komen; in dit geval de gelatinevervloeiing.

Winslow 1919.

WINSLOW, KLIGLER en ROTHBERG (145) gaven in 1919 een schema voor de verdeeling der coli-typhus-achtigen; zij onderscheidden 6 groepen met verschillende typen en varieteiten hierin. De 2 laatste groepen omvatten de lactose-vergistende vormen:

		sal.	sacch.	gel.
groep V.	gasproductie $CO_2/H_2 = 1$.			
	B. neapolitanus, Fraenkel . . .	+	+	
	B. communior, Durham. . . .	—	+	
	B. coli, Escherich	+	—	
	B. acidi lactici, Hüppe	—	—	
groep VI.	gasproductie $CO_2/H_2 > 2$.			
	B. cloacae, Jordan	+	+	+
	B. aerogenes, Escherich	+	+	—

Castellani en Chalmers 1919.

In 1919 geven ook CASTELLANI en CHALMERS (19) een verdeeling, waarbij de eigenlijke colibacteriën direct in 2 hoofdgroepen verdeeld worden en wel naar de indolvorming. De indol-neg. groep telt als eenige vertegenwoordiger de Escherichia coli mutabilis, de andere wordt in 17 soorten verdeeld. Mijn stam, die duidelijk knopvorming vertoonde (st. 348) bleek indol te vormen; ook onder de indol negatieve vormen blijken verder allerlei afwijkingen voor te kunnen komen op de zelfde wijze als bij de indol positieve organismen. Eenige waarde kan ik dan ook niet aan deze verdeeling toekennen.

Bergey 1925.

In zijn Manual geeft BERGEY (10) een zeer groot aantal soorten, gebaseerd op zeer willekeurige gronden. Het geslacht Escherichia omvat 22, Aerobacter 5 soorten.

Men zal uit deze korte beschrijving bemerken, dat een vaste betrekking tusschen de eigenschappen der stammen en hunne beteekenis als aanwijzer eener faecale verontreiniging uit de genoemde stelsels niet te voorschijn komt.

Toch hechten vooral de Amerikaansche bacteriologen nog zeer veel waarde aan het isoleeren van coli-achtige bacteriën, waarvan zij met zoo groot mogelijke zekerheid trachten te bepalen, of deze van faecalen- of niet-faecalen oorsprong zijn. In de eerste plaats krijgen we de onderscheiding in Escherichia (B. coli) en Aerobacter (B. lactis aerogenes). De eerste is meest van faecalen oorsprong, de tweede kan dit echter ook zijn; hier trachten zij dan weer verschilpunten te vinden, o.a. het al of niet vergisten van adonitol (Rogers), dulcitol, saccharose, de citraatproef (Koser, Taylor) (132).

LEVINE (72) geeft als resultaat van zeer veel waarnemingen het volgende tabelletje over het voorkomen van Escherichia-Aerobacter bij verschillende bronnen van herkomst:

herkomst:	*aant. stammen:*	% *Aerobacter:*	% *Escherichia:*
mensch. faeces	2534	5,9	94.1
dierl. „	1832	7,4	92,6
water	2137	35,2	64,8
melk	1382	43,1	56,9
graan	288	81,7	18,3
aarde	853	88,1	11,9

Alhoewel de praktijk uitwijst, dat men met deze methoden een heel eind kan komen, lijkt mij een, hierop gebaseerd, drinkwateronderzoek nooit zonder gevaar. Het bezit van eenige eigenschappen mag voor een colibacterie de *kans* op faecalen oorsprong klein maken, de *mogelijkheid* blijft altijd bestaan.

Een andere methode, welke tot grondslag heeft het meer en meer uiteenloopen van glucose-, lactose- en Eijkmantiter, naar-

mate de infectie van ouderen datum is, lijkt betrouwbaardere resultaten op te leveren.

Men tracht aldus verband te leggen tusschen de ouderdom van de faecale infectie en den graad der gevaarlijkheid, die de infectierest nog bezit, daarbij uitgaande van het welbewezen feit, dat de kiemen der typhus en cholera in water sneller sterven, dan de colibacteriën, die er door het faecale materiaal tegelijkertijd worden ingebracht. Bij onderzoek ziet men, dat, naarmate de ouderdom der infectie toeneemt, eerst de z.g. Eijkmantiter vermindert, terwijl nog de hoeveelheden water, die bij 37° in glucose- en lactosebouillon gisting kunnen verwekken onveranderd blijven. Volgens Clemesha's onderzoek doet voortgezette reiniging echter de hoeveelheid lactose vergistende kiemen later sterk dalen ten opzichte van diegene, die slechts de glucose kunnen vergisten (Clemesha heeft de proef van Eijkman niet gebruikt).

Dit verschil van de lactose- met de glucosetiter zal volgens Holwerda (59) slechts te voorschijn komen door den invloed van het zonlicht. Zonder twijfel is deze factor van zeer groot belang, zooals een eenvoudig proefje met een faecesemulsie, waarvan men één deel op een zonnige plaats, het andere deel in het donker bewaart, ons direct kan leeren: na 3 maanden is de doorzichtigheid van het monster, dat in de zon gestaan heeft zeer goed (kleur van het bezinksel licht grijs) terwijl het andere nog troebel en bruin is. Een viertal proeven met grachtwater bevestigden deze waarnemingen nog. Oorspronkelijk waren de titers resp.: 4-3-3, wat zeggen wil, dat 10^{-4} cc. nog vergisting der glucosebouillon gaf en 10^{-3} cc. van resp. lactosebouillon en Eijkmansche vloeistof (45°). Dit water bracht ik in 4 kolven, één hiervan werd in het volle zonlicht bewaard, de overigen in het donker en wel resp. bij 37°, 20° en 4° C. Na 4 dagen was het resultaat van de titerbepalingen bij de kolf, bewaard:

in de zon: 1 cc. gaf geen gisting meer.
bij 37° : 1-0-0, (1/10 cc. gluc ++, 1 cc. lact. en Eijkm. ++).
bij 20° : 2-2-1,
bij 4° : 3-3-2.

We zien dus een sterke werking van het zonlicht en tevens de groote invloed van de temperatuur op het zelfreinigingsproces.

Hierbij is alleen de gasvorming als criterium aangenomen,

groei trad bij vele verdunningen wel op, zelfs maanden later was dit nog het geval. Een B. sporogenes-proef, (anaeroob cultiveeren, na pasteurisatie, volgens KLEIN) had een pos. resultaat, zoodat deze troebeling denkelijk door een dergelijke bacil zal zijn veroorzaakt.

Over de rol van deze anaeroobe sporenvormers bij het zelfreinigingsproces is nog weinig bekend. HOLWERDA meent in hen de veroorzakers van het uiteenwijken van de lactose- en Eijkmantiter te zien.

Naast de proef van Eijkman om een recente faecale verontreiniging met eenige zekerheid te kunnen constateeren, is in den laatsten tijd de indoltiter van GERSBACH (37) op den voorgrond gekomen. Evenmin als Eijkman beschouwt Gersbach zijn titerbepaling als een specifieke coliproef. Laatstgenoemde geeft zelf toe, dat er zeer vele coli-achtige bacteriën van faecalen oorsprong zijn, die geen indol kunnen vormen.

Evenwel vinden we steeds indol pos. en neg. organismen naast elkaar, zoodat de kans voor faecale verontreiniging bij een neg resultaat klein is. BLUMENBERG (12) speelt in een critiek uit, dat B. coli bij een langdurig verblijf in water zijn vermogen om indol te vormen kan verliezen. Dit is m.i. juist een groot voordeel voor deze proef: een zeer oude infectie geeft geen reactie; precies het zelfde geval als met de proef van Eijkman. SALUS en HIRN (113) bevelen een combinatie aan: een onderzoek naar indolvorming bij 45° onder toevoeging van krijt.

In verband met deze vraagstukken leek het mij gewenscht om na te gaan, of er onder de atypische, lactose vergistende colibacteriën ook organismen te vinden zouden zijn, welke niet in staat blijken, om glucose bij 45° te vergisten. Zij waren inderdaad te vinden, maar ook overigens valt het gemakkelijk in deze groep een groot aantal variëteiten te vinden, die zich door één of meer, soms ondergeschikte, kenmerken van het typische B. coli onderscheiden. Hun kenmerken en hun standvastigheid zullen uitvoerig moeten worden besproken, benevens hun beteekenis voor het onderzoek en de beoordeeling van water.

§ 3 — **Lactose-niet-vergistende bacterien.**

Zijn de lactose-vergistende atypische bacteriën der coligroep zeer uitgebreid onderzocht in verband met het drinkwateronderzoek, veel minder is dit het geval met de lactose-niet-vergistende stammen. Deze bacteriën missen het vermogen om uit lactose binnen 48 uur gas te vormen. We moeten hier scherp onderscheiden, zoodat er geen verwarring met anaerobe sporenvormers, Salmonella's of Proteus-achtige bacteriën plaats vindt.

Dit laatste lijkt mij nog wel eens voorgekomen te zijn. CLEMESHA (21) beschrijft in: „The bacteriology of surface waters in the tropics" eenige vormen, die hij uit faeces geïsoleerd heeft en dus in water kunnen voorkomen. Als gemiddelde van 9 proefnemingen vond Clemesha, dat ongeveer 5 % der glucose-vergistende soorten niet in staat waren om lactose om te zetten. De bacteriën werden nader onderzocht tov. saccharose, dulcitol, adonitol, inuline, V. P. reactie, indolvorming en bewegelijkheid. De 182 bacteriën konden in 12 groepen ingedeeld worden. Eenige mededeeling over de gelatine vervloeiing ontbreekt volkomen. Daar dit het voornaamste verschilkenmerk is van B. proteus met B. coli, vrees ik, dat vele dezer 182 stammen tot de Proteus groep gerekend zouden moeten worden.

De verdere litteratuur over deze bacteriën, in verband met het drinkwateronderzoek, is wel zeer beperkt. Wel treft men van medische zijde vele mededeelingen aan over stammen, welke met deze lactose-niet-vergistende colibacteriën te vergelijken zijn.

Buiten beschouwing blijven hier de Salmonella's (paratyphus B, etc.), waartoe eenige zeer pathogene, meest goed gedefinieerde, organismen gerekend worden. Deze vormen zuur noch gas uit lactose en saccharose, vormen geen indol en kleuren lakmoeswei eerst rood, daarna blijvend blauw.

Soorten, die niet aan deze voorwaarden voldoen en in één of meer punten tot B. coli naderen, vormen nu de groote tusschengroep, welke men zoowel als afwijkingen van B. coli (atypische coli of paracoli) als van Salmonella (Salmonella-achtigen) kan beschouwen, dit is slechts een kwestie van smaak. Echte Salmonella's heb ik, wat ook wel te verwachten was, niet kunnen isoleeren bij mijn onderzoek.

Paracoli.

Zeer veel auteurs hadden de gewoonte aangenomen een atypische colistam met „paracoli" te betitelen, waaronder we dus een zeer uitgebreide verzameling van de meest uiteenloopende organismen kregen te rangschikken. In den loop der tijden zijn vele gelukkig naar de Salmonella's en andere geslachten verhuisd.

Het eerst werden deze bacteriën beschreven door GILBERT en LION (38) [1893], TAVEL en LANZ (131) [1894], HOLST (58) [1894], GERMANO en MAUREA (36) [1894], EHRENFEST (24) [1896], LEMBKE (71) [1896], REFIK (106) [1896], e. a.

In 1895 geeft GILBERT (39) een overzicht over de coligroep. Alle coliachtigen welke onbewegelijk waren, of geen indol vormden of geen lactose konden vergisten, rekende hij tot de „paracolibacillen". Deze werden dan in 5 species verdeeld:

	bewegelijkheid	indolvorming	lactosevergisting
1	—	+	+
2	+	—	+
3	+	+	—
4	—	—	+
5	—	—	—

Onder invloed van de studie's over kalverendysenterie (Kälberruhr) heeft men de paracoli's iets beperkt en rekende er alleen de lactose-niet-vergistende vormen toe. Later bleek deze paracoli tot een variatie van het Gaertner- of Aertrijck (Breslau) type gerekend te kunnen worden. (JENSEN (60), WIEMANN (142), STICKDORN (128), MEISSNER, WETZEL (84), e.a.).

BAHR (7) [1929] wenscht desalniettemin de naam paracoli voor een varieteit der Gaertnerbacteriën te handhaven; dit kan slechts verwarring geven en is daarom te verwerpen.

Bij de bespreking van een kinderziekte, Cholera infantum, stuit men ook herhaaldelijk op de naam paracoli. MORGAN nam een nieuwe bacterie aan (B. morgani), BAHR (5) [1912] vergeleek deze stammen met de kälberruhrstammen van Jensen en beschreef nog een pseudocoli en een metacoli.

PRELL (102) [1917] onderscheidt bij B. coli naast een communevorm een paracoli- en een mutabile-vorm.

Uit de faeces van gezonden of van zieken en reconvalescenten,

die typhus, paratyphus of dysenterie hadden gehad, isoleerde GYÖRGY (51) [1918] een groot aantal paracolistammen. Hij vergeleek deze naar hunne eigenschappen onderling en in vergelijking met eenige nauwverwandte bacteriën.

Alleen de onbewegelijke vormen worden beschouwd, alhoewel de schrijver zelf herhaaldelijk op de groote moeilijkheden wijst, om zeker te kunnen beoordeelen of een bacterie werkelijk onbewegelijk is en o.a. zegt: „.... daher scheint uns eine Differenzierung der Paracoli-Bazillen auf Grund der Beweglichkeit undurchführbar."

Tegenover 20 substraten zijn de 47 stammen te verdeelen in 19 groepen. Door agglutinatie-proeven kon geen verband gevonden worden tusschen de onderzochte stammen en paratyphus A, B, Gaertner, Shiga of Flexner bacteriën (Aertrijck serum werd helaas buiten beschouwing gelaten). Wel wist György op serologische gronden een verdeeling te maken, welke meestal parallel ging met zekere modellen en vormveranderingen van het kolonietype (TRAWINSKY) (137).

Bij een onderzoek naar het voorkomen van echte Salmonella's bij varkens in Nederland brengt GOSLINGS (41) [1928] het paracoli vraagstuk ook ter sprake. Vooral aan het uitblijven der indolvorming hecht hij veel waarde en acht het: „misschien wenschelijk alle indol-positieve Salmonella-achtige stammen samen te vatten onder de naam paracoli".

Goslings kon slechts één typische Salmonella krijgen (uit 100 varkens), welke zijn eigenschappen blijvend hield. Alle anderen waren atypische vormen met zeer wisselende eigenschappen en een neiging om bij 37° naar de typische B. coli over te gaan.

Van recente datum zijn de onderzoekingen van LER. D. FOTHERGILL (30), die „atypische paratyphus bacillen" beschrijft en hier de zelfde sporen-vrije bacteriën mede bedoelt, als de vorige onderzoekers; de 32 stammen, geïsoleerd bij acute diarrhea bij kinderen vergistten lactose niet of met een „latent reaction". Werd een substraat vergist, dan geschiedde dit steeds onder gasvorming, inuline en inositol werden nooit aangetast, glycerol zelden, salicine, dulcitol en saccharose meer.

In de classificatie van CASTELLANI en CHALMERS (19) lijkt het, of men paracoli-bacteriën zou kunnen indeelen. Zij onderschei-

den in de tribus Ebertheae onder de glucose vergistende vormen n.l.:

geslacht	glucose	lactose	melk
6 Salmonella	++	—	—
7 Balkanella	++	—	+
8 Wesenbergus	++	+	—
9 Enteroïdes	++	++	—
10 Escherichia	++	++	+

(+: zuurvorming, resp. coagulatie
++: zuur- en gasvorming).

De door mij beschreven para-colibacteriën laten zich, op grond hunner overige eigenschappen, niet in deze geslachten onderbrengen.

§ 4 — **Indeeling van het onderzoek.**

Zeer weinig is dus nog bekend over het voorkomen in water van atypische colibacteriën, welke lactose niet onder gasvorming vergisten. Een nader onderzoek hiernaar leek dan ook gewenscht, terwijl dan tevens de mogelijkheid, dat met bepaalde organismen een faecale verontreiniging zou kunnen worden aangetoond, onder de oogen werd gezien.

Wat de lactose-vergistende vormen betreft, is het groote belang, welke de proef van Eijkman voor het onderzoek kan hebben, nooit algemeen erkend. Op grond van het tevoren vermelde spoedige achteruitgaan van de hoeveelheid bij 45° vergistende colibacteriën uit water, dat zich in een toestand van zelfreiniging bevindt, meende ik aan de proef van Eijkman een grootere waarde te moeten toekennen. Bij deze zelfreiniging zou men zeker kunnen verwachten, dat Eijkman-negatieve organismen na verloop van tijd een rol gaan spelen. Daarom heb ik vooral naar dergelijke bacteriën gezocht en de Eijkman'sche reactie mede als hoofdverschilkenmerk aangenomen naast de lactosevergisting. Men komt op deze wijze tot een nieuwe groepeering der coligroep, die geheel is ingesteld op het wateronderzoek, zooals dat door Clemesha (21) en Flu (29) en later door Smit (124, 125) is aanbevolen.

Als gevolg hiervan zal het aantal groepen dus vier bedragen en wel:

	lactose:	Eijkman:
groep I:	gasv.	gasv.
„ II:	gasv.	—
„ III:	—	—
„ IV:	—	gasv.

(gasv.: gasvorming; —: geen gasvorming).

Tot de bacteriën der eerste groep zullen dus de gewone colistammen gerekend moeten worden; toch treft men hierbij al sterk afwijkende vormen aan, zoodat hier ook reeds eenige atypische vormen gevonden worden.

De andere groepen missen het vermogen om lactose-pepton en/of Eijkmansche vloeistof bij 45° onder gasvorming te vergisten. De vorming van zuur blijft voorloopig buiten beschouwing.

De drie eerste groepen zouden overeen kunnen komen met die van Taylor, Martin, Naidu en Naidu (132), zooals zij de B. coli tabel van McConkey in meer en minder resistente soorten hebben verdeeld.

De vierde groep ontstaat dan als logisch gevolg van de drie anderen; vertegenwoordigers hiervan in water zijn niet te verwachten, langs andere wegen waren ze evenwel te isoleeren.

De bacteriën dezer groepen dienden nu vóór een mogelijke classificatie eerst uitvoerig onderzocht te worden op hunne morphologische en chemische eigenschappen. Hierbij werd gelegenheid gevonden om van vertegenwoordigers van elke groep gistingsbalansen op te stellen.

Een volgend vraagstuk was het ontstaan der atypische stammen. Hoewel vrij algemeen aangenomen wordt, dat deze bacteriën oorspronkelijk reeds in het water voorkomen en een grootere resistentie vertoonen tegenover het zelfreinigingsproces, kan deze verklaring niet voldoen. Persoonlijk ben ik de meening toegedaan, dat de overgroote meerderheid der atypische stammen uit normale colibacteriën zullen ontstaan, zich dus vormen gedurende de zelfreiniging. In de meeste gevallen zijn deze vormen gemakkelijk te regenereeren; de mogelijkheid bestaat evenwel, dat een meer of minder duidelijke fixatie optreedt. Met behulp van variabiliteitsverschijnselen en de afsterving dezer bacteriën in steriel water heb ik geprobeerd deze opvatting te steunen.

HOOFDSTUK II.

Isoleering der onderzochte stammen.

§ 1 — **Uit water.**

In verband met de in het vorige hoofdstuk gegeven beschouwingen over de zelfreiniging van water, was het allereerst aangewezen, de betreffende bacteriën te zoeken in water, dat zich in een toestand van zelfreiniging bevond.

Daartoe werden op 13 September 2 emmers, gevuld met gracht-water uit de Mauritskade en vijverwater uit het Oosterpark, afgedekt met een glazen plaat, weggezet in de open lucht op een beschaduwde plaats. Voor het grachtwater gaf een titer-bepaling onderstaand beeld:

verd:	—3	—4	—5	—6
Eijkm.	++	—	—	—
lact.	++	+	—	—
gluc.	++	++	—	—

++: gas en troebel.
— : alleen troebel.

In goede overeenstemming hiermee was een kiemtelling, die 25.000 bacteriën per cc. aangaf (op agar). Glucosebuis 3 en 4 werden nu uitgestreken op Endo-agar; 3 gaf als beeld roode kolonie's met metaalglans en omgeving duidelijk rood (rd ++), en bleekgroeiende bacteriën; uit buis 4 ontstonden alleen de laatstgenoemden. Karakteristieke, alleen liggende kolonie's werden weer terug geënt in glucose-bouillon. Indien zij deze krachtig vergistten en als microscopisch beeld Gram-negatieve, korte staafjes vertoonden, werden hiervan na herhaald uitstrijken reinculturen geïsoleerd. Zoo isoleerde ik uit glucose-buis 3 de stammen: 260 en 261, uit 4: 262 en 263. De eerste twee behooren tot groep I, de anderen tot groep III.

Een andere methode om tot atypische (Eijkman-negatieve) stammen te geraken was, om van de telplaat-4 de kolonie's, 4 stuks in dit geval, af te enten. De resultaten zijn evenwel zeer

slecht: òf men krijgt geheel geen groei op Endo-agar, òf het zijn normale coli-bacteriën.

Op 17, 21, en 26 Sept. werden opnieuw de titers bepaald en de buisjes, die daarvoor in aanmerking kwamen, wederom uitgestreken op Endoplaten. In verreweg de meeste gevallen kon ik zoo slechts bacteriën afzonderen, welke het vermogen om gas te vormen, volledig misten, slechts een klein gedeelte vormde uit glucose-bouillon gas en deze werden nader onderzocht.

Ook het vijverwater heb ik op overeenkomstige wijze nagegaan. Het oorspronkelijke aantal bacteriën bedroeg hier 2.000.000 per cc.

Het resultaat voor beide soorten water moge hier volgen:

		uit grachtwater	uit vijverwater
Groep	I:	stam: 260	stam: 69
		„ 71	„ 257
		„ 261	„ 259
„	II:	„ 84	„ 258
„	III:	„ 262	
		„ 263	
		„ 452	
		„ 456	

Het is dus mogelijk, om op deze wijze van B. coli afwijkende stammen te krijgen; echter moet men niet te lang wachten en blijken er slechts zeer weinig stammen over te blijven.

Een overzicht van de eigenschappen dezer stammen vindt men in tabel 3. Zij blijken allen zich verschillend tegenover differentiatie-media te gedragen. Opvallend is, dat alle stammen der groepen II en III citraat kunnen vergisten.

§ 2 — **Stammen uit faeces.**

Het leek gewenscht, ook langs andere wegen tot coli-achtige organismen te komen. Het eerst werd gewone menschelijke faeces onderzocht.

Brengt men een emulsie van faeces met water direct op Endo, dan zijn de resultaten slecht; meestal geen groei. Na één dag laten staan bij kamertemp., werd een mooie Endocultuur ver-

kregen; er waren 3 soorten kolonie's direct te onderscheiden:

1/ rood, duidelijke metaalglans (93,94)
2/ „ geen „ (95,96)
3/ wit (97,98).

Allen waren gluc. ++, Eijkm. ++., M.R. +, V.P. —.

	lact.	sacch.	indol.
93,94	++	—	—
95,96	++	—	+
97,98	+	+(+)	+

St. 97 en 98 zijn vooral merkwaardig, zij zouden tot gr. IV gerekend moeten worden. Echter zijn beiden zeer variabel; Eijkman's reactie is zwak en tenslotte wordt ook lactose onder zeer zwakke gasvorming omgezet. Op Endoplaten zien we na 3—4 dagen roode puntjes ontstaan. Zonder twijfel heb ik hier dus een zelfde geval als Massini met zijn B. coli mutabile. Ik kom hier uitvoerig op terug.

§ 3 — **Stammen uit urine.**

Een bepaald monster bleek hoofdzakelijk op Endo wit groeiende stammen te bevatten. Het was afkomstig van een ♀ patient, lijdende aan galsteenen en een blaascatarh [1]).

micr. beeld: B. coli en leucocyten.
Endo „ : bleekgroeiende kolonie's.
Van de Endoplaat werd st. 348 geïsoleerd.

Voorbroeding in gluc. en lact. bouillon, gedurende 1—2 dagen en afstrijking daarna op Endo, leverde een geheel ander beeld op:

gluc: witte kolonie's, na eenigen tijd roode knopjes.
lact: groote kolonie's met metaalglans, plaat helder rood; hiervan werd st. 341 afgezonderd.

Dat st. 341 niet de lactose vergistende vorm van st. 348 is, blijkt wel uit hun verschillend gedrag tov. saccharose (zie tabel).

§ 4 — **Stammen uit excrementen van koudbloedige dieren.**

Een andere bron om afwijkende coli bacteriën af te zonderen, leek gegeven in de excrementen van koudbloedige dieren. De proef van Eijkman is immers juist bedoeld als verschilkenmerk

[1]) Het monster werd mij ter hand gesteld door den Heer J. H. C. Freijer, arts.

met de faeces der warmbloedigen. Ook in de litteratuur komt men vondsten van atypische colibacteriën hierin tegen.

Remmelts (107) [1912] kon, ondanks kleine verschillen tov. de melkstremming en de vorming van een huidje op zure bouillon, geen verschil vinden tusschen de colibacteriën van verschillende zoogdieren en vogels. Die van visschen (aal) weken af naar het paracoli-type.

Darling (22) [1923] onderzocht o.a. salamanders, kikkers, slangen en visschen en vond slechts geringe verschillen tov. melkcoagulatie, saccharose, enz. Wat de verhouding Escherichia-Aerobacter betreft, vindt Darling als percentage Aerobacter:

0 % beer, hond, kat, muis.
4 % geit, eend, kikker.
9 % salamander.
11 % slang.
17 % visschen.

dus bij koudbloedigen wel meer; de overgroote meerderheid blijven toch altijd de Escherichia's vormen. Onderbrenging in Levine's stelsel gaf geen resultaat. Darling concludeert dan ook: „Er is geen onderscheid tusschen menschelijke en dierlijke B. coli."

Salus en Hirn (113) [1923] isoleerden uit salamanders een B. coli comm. met een pos. reactie van Eijkman.

Stutzer (130) [1926] vond in de faeces van hagedissen, kikkers, adders en visschen o.a. bacteriën, identiek of zeer nauw verwand met normale colistammen en paracoli bacteriën.

Hermann Schroeder (116) [1927] daarentegen kon zeer zelden B. coli comm. in de darmen van zee- en zoetwatervisschen aantoonen; de gistingsproef van Eijkman was steeds neg. Vrij algemeen kwam een paracolibacterie voor (Bact. coli imperfectum).

Door bemiddeling van den Heer A. F. J. Portielje, inspecteur van het Kon. Zool. Gen. Natura Artis Magistra, ben ik in staat geweest om 11 monsters dierfaeces te onderzoeken.

Met de grootst mogelijke zorg werden de uitwerpselen verzameld; een weinig materiaal uit het binnenste der faecesbrokken werd in water gesuspendeerd en dit direct op twee Endoplaten uitgestreken. Tevens werd voorgebroed in glucosebouillon bij

24°, 37° en 45°; na 3 dagen werden ook deze op Endoagar uitgestreken.

Van alle Endoplaten heb ik zooveel mogelijk verschillende karakteristieke kolonie's in glucosebouillon gebracht en, indien dit onder gasvorming vergist werd, deze als reinculturen geïsoleerd. Door herhaald overenten werden de Gr. + organismen verwijderd.

De onderzochte dieren zijn meest reptielen, verder een slak en een amphibie.

OPHISAURUS. (orde: Hagedissen), Ophisaurus apus, Pall.

Endobeeld: witte kolonies en roode . . . st. 342.
verder Gr. pos. coccen.
Voorbroeding bij 24°: geen groei.
„ 37°: groei. . . . . st. 389.
„ 45°: „ : . . . . . st. 433, 449.

WARAAN. (orde: Hagedissen), Varanus griseus, Daud.

Directe uitzaaiing op Endoplaten gaf zwak roode kolonie's: . . . . . st. 369.
Bij voorbroeding trad nergens gisting op.

KAAIMAN. (orde Krokodillen), Caiman palpebrosus.

Direct op Endoplaat: witte kolonies (gl. +), slijmerige crème kolonies (Gr. + coccen) en enkele roode . . . . . st. 343.
Alleen voorbroeding bij 24° had succes . . . st. 390.

ORINOCO KROKODIL. Crocodillus intermedius, Graves.

Directe uitzaaiing leverde alleen Gr. pos. coccen op. Voorbroeding bij 45° gaf wel vergisting, doch geen groei op Endoagar. Bij 37°. st. 448.
bij 24° . . . . . st. 435.

GAVIAAL. (orde Krokodillen), Tonistoma schlegeli.

Endobeeld: 4 verschillende typen, allen gl. ++:
metaalglans en omgeving rood: . . . . . st. 347
zonder metaalglans: . . . . . st. 344.

alleen de kolonie rood: . . . . . st. 346.
een witte, stervormige kolonie: . . . . . st. 345.
Voorbroeding bij 37°. . . . . st. 434.
„ 24°. . . . . st. 391, 392.

BOA (jong), (orde Slangen), Boa constrictor.
Op geen enkele wijze heb ik een gluc. ++ organisme kunnen isoleeren.

PYTHON. (orde Slangen), Python reticulatus.
Endobeeld: vele typen, allen gluc. ++:
concentrische ringen: . . . . . st. 362.
rood, metaalglans: . . . . . st. 365.
rose: . . . . . st. 366.
wit: . . . . . st. 364, 367.
Voorbroeding bij 37° gaf ook een groote verscheidenheid van stammen, rood: . . . st. 395, 436.
wit: . . . . . st. 396, 437.

TAKSLANG. (orde Slangen), Boiga dendrophila, Boie.
Endobeeld: zwak roode kolonie's: . . . . st. 374, 375.
een crème kolonie: . . . . . st. 373.
Voorbroeding bij 24°: . . . . . st. 398.

RATELSLANG. (fam. Adders), Crotalus horridus, L.
Op Endoagar: 2 roode kolonie's: . . . . . st. 371, 372.
een slijmerige witte kolonie: . . . . . st. 370.
Voorbroeding bij 24°: . . . . . st. 397.

PAD. (klasse Amphibieën), Bufo marinus, L.
Directe uitzaaiing op Endoagar, evenmin als voorbroeding bij 37° en 45°, gaf gasproduceerende bacteriën. Bij 24°: . . . . . st. 393.

SLAK. (Weekdier), Achatina folica.
Endobeeld: licht bruine kolonie's (gluc. +).
rose kolonie: . . . . . st. 363.
Voorbroeding bij 24°: . . . . . st. 394.

In het geheel werden dus 37 culturen geïsoleerd; eenigen hiervan zullen wel identiek blijken, terwijl ook eenige Proteus-soorten verwacht kunnen worden. Daarom heb ik, alle stammen voorloopig onderzocht.

10 bleken gelatine binnen 48 uur volledig te vervloeien, op

Endoplaten vormden deze een vlies. Een elfde stam vertoonde alleen de laatste eigenschap, doch in zulk een hevige mate, dat ik ook deze tot Proteus heb meenen te moeten rekenen. Al deze stammen konden verder buiten beschouwing worden gelaten. (st. 434, 393, 395, 362, 396, 437, 436, 372, 375, 374 en 373).

Het viel op, dat de lactoseontleding zeer wisselend kon zijn. Op Endoplaten vertoonden 3 stammen ook de typische roodkleuring met metaalglans; deze is dus niet alleen voor B. coli en B. aerogenes karakteristiek. Het blijkt dus, dat 33 % der stammen, geïsoleerd bij koudbloedige dieren, tot de Proteus-achtigen behooren.

De eigenschappen der andere stammen zijn te vinden in tabel 2. Identiek bleken de stammen 343 en 390 (Kaaiman), 392 en 391 (Gaviaal), 435 en 448 (Crocodil), 366 en 367 (Python). De stammen 345 en 346 (gr. IV, Gaviaal) zullen, ondanks aanvankelijk kleine verschillen, wel identiek zijn.

Resumeerende bleken dus de 37 stammen te zijn:

11	Proteus	30 %
11	Escherichia	30 %
5	Aerobacter	13 %
10	paracoli	27 %.

HOOFDSTUK III.

Eigenschappen der Bacterienstammen.

§ 1 — **Inleiding.**

In het vorige hoofdstuk hebben we gezien, op welke wijze de stammen verkregen zijn. Een eerste poging werd nu gedaan, om deze te classificeeren. Hierbij werd tevens gelegenheid gevonden, om eenige reactie's nog eens aan een nader onderzoek te onderwerpen en het gedrag van bacteriën der heele coli-typhus groep t.o.v. bepaalde differentiatie-media na te gaan. Behalve mijn „eigen stammen" werden hiertoe een 40-tal reinculturen, afkomstig uit de verzamelingen van het Laboratorium voor de Gezondheidsleer en het Instituut voor Tropische Hygiëne te Amsterdam en de Rijksseruminrichting te Rotterdam, nader aangeduid als: „lab. stammen", zoonoodig mede onderzocht.

Morphologische verschillen tusschen de stammen onderling zijn zeer gering, maar ze bestaan. Echter zijn noch de vorm der bacteriën zelf, noch hunne groeiwijze op agar of gelatine bruikbaar ter differentiatie. Bewegelijkheid en kapselvorming kunnen, naar mijn meening, evenmin in aanmerking komen; beiden zijn te sterk afhankelijk van, grootendeels onbekende, uitwendige factoren.

§ 2 — **Gelatine vervloeiing.**

Bij de isoleering van mijn stammen heb ik hiervan veel voordeel gehad om de Gram-neg. glucose vergistende bacteriën snel te differentieeren in Proteus- en Coliachtigen. De snelle gelatinevervloeiers zijn zoo na 2-3 dagen door een gewone steekcultuur in gelatine direct af te zonderen.

Zeer langen tijd duurt het bij de andere soorten, voor men iets van de vervloeiïng merkt. Proeven met lab. stammen, vermeld als paracoli en B. cloacae gaven pas na ca. 26 dagen broe-

den bij 24° een duidelijke vervloeiïng. Bij mijn gelatine-positieve stammen (st. 394, 262 en 263) was dit na 24 dagen het geval, voor st. 398 na 35 dagen.

§ 3 — **Melkcoagulatie.**

Ook hierbij speelt de tijdfactor een voorname rol. De normale coli- en aerogenes-stammen stremmen de melk allen volledig binnen 2-3 dagen, een kleine afwijking t.o.v. Eijkman of Endo verhoogt deze tijd in de meeste gevallen (bacteriën van groep II).

Paracoli-bacteriën stremmen pas na langen tijd, wisselend van 5-12 dagen, of in het geheel niet. Dit laatste is het geval bij stammen, welke uit lactose noch zuur, noch gas vormen. Lakmoeswei volgens Petruschky kleurt zich bij deze stammen, al of niet na een aanvankelijke roodkleuring, blauw.

Bij eenige stammen had een duidelijke peptonisatie plaats, nl. 435, 364 en 369; zij naderen hierdoor tot de Salmonella Schottmülleri en S. Aertrijck, hetgeen nog gestaafd wordt door het overeenkomstig gedrag tegenover lakmoeswei.

§ 4 — **Lakmoeswei (Petruschky).**

De lactose snel vergistende bacteriën zullen over het algemeen genoeg zuur vormen, om lakmoeswei dadelijk blijvend rood te kleuren, typische Salmonella's kleuren dit medium eerst rood, daarna blijvend blauw.

Onder de paracoli-stammen treft men herhaaldelijk een afwijking aan. De eerste uren is de wei rood, daarna eenige dagen blauw, om dan weer in blijvend rood om te slaan. Deze typische, dubbele kleuromslag is vooral door Györgi (51) uitvoerig nagegaan en hij wees er op, dat eenige dagen na de tweede omslag de melkcultuur coaguleerde, terwijl dit verschijnsel tevens gepaard ging met z.g. knopvorming op lakmoes-lactose-agar, op de wijze als Massini's B. coli mutabile. Hij komt voor zijn paracoli stammen dan ook tot het resultaat, dat „die Milchgerinnung bei Stämmen, die ursprünglich Laktose nicht zu spalten vermögen, durch das Auftreten von („mutierten") Tochterkolonien, die Milchzucker spaltende Fermente enthalten, bedingt wird. Dasz die Lakmusmolke nach dem ersten, blauen Umschlag bei Stämmen,

die eine Knopfbildung im oben beschriebenen Sinne zeigen, wieder gesäuert, d.h. rot gefärbt wird, beweist ebenfalls das Auftreten von Laktose unter Säurebildung vergärenden Fermenten".

György vindt drie uitzonderingen, deze stammen blijken saccharose wel, maar dulcitol niet onder gasvorming te vergisten.

Ook Goslings (41) heeft voor zijn Salmonella-achtigen het gedrag in melk, lactose bouillon en lakmoeswei uitvoerig vergeleken, helaas ontbreken opgaven over „mutatie" knoppen. 15 zijner stammen geven de dubbele kleuromslag, 13 hiervan stremmen melk na verloop van tijd, 14 vormen zuur uit lactose en 5 zelfs gas. De 3 afwijkende stammen vergisten alle drie saccharose goed, evenals die van György dus. Eén stam (X 25) was nog aanwezig, waarvan ik de knopvorming heb nagegaan. Deze had inderdaad plaats, terwijl in overeenstemming daarmee dulcitol niet vergist werd.

Mijn stammen 348 en 98 vertoonen beiden een sterke knopvorming en de dubbele kleuromslag.

De bacterieën van de groepen I en II kleuren lakmoeswei direct blijvend rood (uitgez. 348). Bij de twee laatste groepen treffen we of een blijvende, of een aanvankelijke roodkleuring met omslag naar blauw aan. Het eerste is nu het geval bij alle vier de waterstammen in groep III in tegenstelling met die uit slangen, etc.

§ 5 — **Indolvorming**

Eenige correlatie tusschen indolvorming en een andere reactie heb ik niet kunnen vinden. Onder colibacterieën van iedere oorsprong zal men zoowel indol + als — organismen kunnen vinden, zonder dat men hieruit gevolgtrekkingen mag maken.

Zooals indol gevormd wordt uit tryptophaan, voorkomende in pepton, ontstaat uit tyrosine in sommige gevallen fenol. Volgens Rhein (109) sluiten indol- en fenolvorming elkaar uit. Nu is het een bekend verschijnsel, dat kleine hoeveelheden fenol de indolvorming tegengaan, zoodat dit geen verwondering behoeft te verwekken. Fabry (27) [1922] voegde 5/100 % fenol toe aan het cultuurmedium en verkreeg daardoor een colistam, die behalve andere agglutinatorische eigenschappen ook blijvend indol neg. bleef (B. coli communior modifié). Smirnow (121)

[1916] verkreeg ook door fenoltoevoeging afwijkende colivormen, welke het eerst het vermogen om indol te vormen verloren.

Daar vele organismen alleen verschillen in indolreactie, doch verder absoluut gelijk lijken en de proef met vele moeilijkheden gepaard gaat, zijn vele onderzoekers geneigd minder waarde aan deze proef te hechten.

Echter blijft het merkwaardig, dat alle typische Salmonella's indol neg. zijn. GOSLINGS (41) vond evenwel, bij 4 stammen, die eerst indol neg. waren, na 14 dagen bewaren, een pos. reactie. Van 2 stammen waren alle nakomelingen (op Endo uitgestreken) blijvend indol pos., van de anderen gedeeltelijk + en —.

Ook VAN LOGHEM (74) bericht over variatie's. Een paratyphus stam (indol-negatief) door genoemden onderzoeker in 1906 uit Straatsburg mede gebracht, bleek in 1918 indol te vormen. Bij uitzaaiing gaven 6 van de 9 beschouwde kolonie's indolvorming, de anderen niet. Tevens werden 3 kolonie's door paratyphus B serum niet meer geagglutineerd, zelfs niet in verdunning 1 : 25.

PECKHAM (92) wist in 1897 een typhusstam indolvormend te krijgen. Beschouwen we deze feiten uit modern standpunt, dan komt het dus hierop neer, dat deze bacterieën het ß indolazijnzuur wel als koolstofbron kunnen gebruiken [1]) en dit verder afbreken tot indol.

De lab. stammen heb ik behalve op indol, ook op vorming van dit zuur onderzocht en alleen bij Aerobacters, welke geen indol vormen, de verkleuring duidelijk kunnen waarnemen (met verdund $FeCl_3$), ook bij de rhinoscleroomstam. Vermeld moge nog worden, dat deze anindologene Aerobacters een opvallend slijmerige groei vertoonen.

Mijn stammen 347, 263 en 435 (V.P. + en ind. —) geven eveneens een pos. reactie op ß indolazijnzuur, hoewel veel zwakker.

§ 6 — **Reactie van Voges-Proskauer en Methylrood-proef.**

Deze reactie's werden uitgevoerd na 5 dagen broeden bij 30° C. Toevoeging van Na_2O_2 (Bedford) (9) of H_2O_2 (Levine) (72) om de V.P.reactie te versnellen vereischt veel zorg en is over

[1]) Zie DE GRAAFF (42).

het algemeen niet aan te bevelen. Een veiligere methode is, om het medium na KOH toevoeging tot den volgenden dag te bewaren.

De proef is zeer betrouwbaar en verdient dan ook zeker, vooral in medische kringen, meer belangstelling. Slechts weinig slechte resultaten worden vermeld (Stovall en Starr Nichols (129), Paine (91).)

De helft der V. P. vloeistof werd voor de M.R. proef gebruikt. B. coli groeit tot de vloeistof een p_H bereikt heeft van 4,37—4,55. T.o.v. methylrood, dat bij een p_H van $\pm$ 5,3 omslaat, reageert het medium dus zuur (rood). Daar B. aerogenes minder zuur produceert, zal bij een beperkte hoeveelheid glucose minder zuur gevormd worden. Terwijl B. coli afsterft, kan B. aerogenes nog verder groeien en zal uit het pepton NH_3 vormen.

Ayers en Rupp (4) nemen tevens aan, dat de gevormde zuren weer ontleed worden in (bi)carbonaten. Het resultaat is evenwel, dat het cultuurmedium alkalisch (geel) zal reageeren.

Op een typische wijze openbaart dit verschijnsel zich. Laat men n.l. de methylrood proeven een dag staan, dan zullen de gele buizen ontkleurd zijn: de kleurstof is totaal gereduceerd door de nog steeds doorgaande bacteriëngroei. De roode buizen daarentegen blijven rood. Hierin heeft men nog een middel om in twijfelachtige gevallen (rood-oranje b.v.) de knoop door te hakken.

Slechts weinig stammen vertoonen afwijkende resultaten: t.o.v. M.R. oranje ($\pm$) waren: 370 en 435 (beiden van gr. III), en tevens eenige lab. stammen n.l. B. rhinoscleroma, B. ps. dys., 2 B. aerogenes, 2 B. proteus, en een Friedländerstam.

Zoowel V.P. + als M.R. + waren:

st. 398, 397 en 433 (gr. I) als 84 (gr. II).

Herhaaldelijk zijn deze afwijkende stammen onderzocht, doch steeds kreeg ik de zelfde resultaten.

§ 7 — **Citraat proef.**

Koser (68) merkte in 1925 op, dat Escherichia's niet, Aerobacters wel met citraten als C bron kunnen groeien. Hij concludeert dit uit het troebel worden der cultuur vloeistof.

Aerogenes bacteriën groeien hierin, terwijl B. coli van faecalen

oorsprong hierin niet, die uit granen, aarde, enz. wel zouden groeien. Inderdaad wijzen vele proeven hierop; citraat pos. organismen treden bij de zelfreiniging van water langzamerhand op den voorgrond. (Holwerda (59), Taylor (132) c.s.).

Simmons (119) beveelt platen met een indicator aan; hiervoor gebruikt hij Br. thymol blauw (di-Br. thymol sulpho-phtaleïne). We krijgen dan deze omslag:

geel → p_H : 6 → groen → p_H. : 7,6 → Pruis. blauw.

Hill c.s. (56) pasten deze methode toe bij coli- en aerogenesbacteriën uit urine; van hunne 100 Escherichia's groeiden er 54 heelemaal niet, 11 kleurden de platen diep blauw, 25 produceerden zuur. Van de 79 Aerobacters groeiden er slechts 38 % zooals Simmons dit aangeeft, dwz. direct blauw.

Daar tegenwoordig meer en meer waarde aan de citraat-reactie gehecht wordt, heb ik het gedrag mijner stammen tov. beide media (Koser en Simmons) vergeleken.

Proeven met lab. stammen gaven tot resultaat, dat Eberthella's de kleur niet veranderen, Salmonella's maken deze blauw (uitgez. een Glässer-stam), evenals paracoli.

Typische Aerobacter aerogenes kleurt de plaat in één dag blauw en slaat dan in geel om; meestal geringe diffusie; slechts de kolonie's zijn helder kanarie-geel, cloacae-bacteriën blijven daarentegen blauw, zoodat we hierin een vlugger middel hebben, om deze soorten te onderscheiden.

Eigen stammen: Van gr. I vertoonen de 4 V.P. + organismen, allen in Koser's medium een duidelijke groei; twee hiervan veranderen daarentegen de voedingsbodem van Simmons niet, de anderen kleuren deze blauw. Drie Escherichia stammen zijn in beide gevallen citraat pos. In Gr. II en IV wisselende resultaten.

gr. III: Alle stammen, behalve st. 435, maken Koser's vloeistof duidelijk troebel en kleuren de citraatplaten blauw.

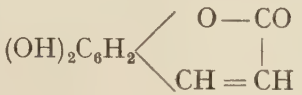
Van de 39 stammen zouden volgens Koser 19 pos. zijn, volgens Simmons slechts 16. Afwijkend zijn st. 397, 449 en 258. Groote voordeelen biedt de plaatmethode over het algemeen dus niet.

§ 8 — **Splitsing van Aesculine.**

Ook deze splitsing zou voor Aerobacters en Escherichia's een

goed differentiatiemiddel zijn (53). Het medium wordt het beste bereid, door uit te gaan van gistagar, dit te neutraliseeren, tot zwak alkalisch en toe te voegen 0,1 % aesculine en eenige kristalletjes ferri-ammonium-citraat. Hiervan giet men platen; deze hebben een grijze tint, met zwakke, blauwe fluorescentie, welke door een weinig verdund HCl verdwijnt. Loog heeft geen invloed.

Sommige bacteriën bezitten nu het vermogen, om het aesculine om te zetten in glucose en aesculitine, het di-oxy-cumarine:



dat met Fe··· een typische bruine kleur geeft.

Eigen stammen: Van gr. I waren 11 stammen + (bruin), en 10 neg., zonder dat ik eenige correlatie, met welke eigenschap ook, kon ontdekken.

Van de 6 stammen der IIe groep blijken de 4 salicine vergistende aesc. +, de 2 salicine-niet-vergistende aesc. —. Bij bestudeering van gr. I zijn ook hier de 5 stammen, welke uit salicine geen zuur kunnen maken, aesc. —.

Van st. 342 en 347 heb ik de salicine vergistende variëteit kunnen maken, die, op de voedingsbodem gebracht, nu beiden inderdaad in staat bleken om de aesculineplaat duidelijk bruin te kleuren.

Groep III en IV geven ieder 2 aesculitinevormers, welke tevens de eenige salicine vergistende stammen in deze groepen zijn. St. 456 en 364 heb ik ook in hun salicine vergistende vormen kunnen toetsen aan de mogelijkheid van aesculinesplitsing. St. 456 Sl. was nu ook aesc. + geworden, st. 364 Sl. daarentegen niet, hoewel deze stam uit sal. zeer veel gas vormde.

Hieruit volgt dus: indien een bacterie aesculine kan omzetten, zal ook steeds salicine vergist worden, omgekeerd evenwel niet.

Ter contrôle heb ik deze regel getoetst aan 40 lab. stammen, 24 hiervan vormden in 1—2 dagen duidelijk een bruine zône.

Eberthella: neg. (B. rhinoscleroma pos.)

Salmonella en Escherichia: om en om.

Aerobacter en paracoli stammen: overwegend pos.

Ook hier waren al deze 24 stammen salicinevergisters, hoewel dit zich soms pas na 3 of meer dagen openbaarde.

§ 9 — **Haemolyse en Haemodigestie.**

Indien men bacteriën ent op bloedagarplaten (2—5 % geitenbloed), ziet men veelal een verdwijnen van de roode kleur om de entstreep; er vormt zich een hof, met een groenachtige weerschijn. Bij een onderzoek over Vibrio cholera en V. Tor is aan VAN LOGHEM (73) gebleken, dat we hier met twee verschillende processen te maken hebben. Bij V. Tor. krijgen we een zuivere haemolyse, het bloed treedt uit en diffundeert weg, bij V. cholera wordt het bloed evenwel verteerd; van Loghem noemt dit haemodigestie. Indien men een paar druppels bloed brengt in buisjes met bouillon, en deze met de betreffende bacterie ent, zal in het eerste geval de heele buis rood worden, in het tweede wordt het afgescheiden bloed onmiddellijk verteerd.

De techniek is dus:

maak streepcultures op bloedagar platen; treedt er hofvorming op, ent dan in bloedbouillon:
a) heele buis kleurt zich rood: haemolyse.
b) vloeistof blijft ongekleurd: haemodigestie.

SNAPPER (126) heeft het verschijnsel spectroscopisch nagegaan.

Slechts enkelen van mijn eigen stammen tasten bloed aan; hofvorming trad op na 2—3 dagen bij st. 93, 348, 433, 449, 389, 69, 98, 394, en 366; overenten in bloedbouillon wees aan, dat de laatste 2 stammen haemodigestief waren; de overigen waren haemolytisch.

Lab. stammen: bloedaantasting trad alleen op binnen 2—3 dagen bij de stammen S. Aertrijck, coli-urine, coli-hert, coli-kat, en in mindere mate bij coli-mastitis-rund. Deze laatste stam was haemodigestief.

Laat men de geënte platen eenigen tijd staan, dan zal bijna steeds verandering optreden, waardoor de beoordeeling zeer bemoeilijkt wordt.

Eenige waarde voor het wateronderzoek tov. B. coli hebben deze proeven niet.

§ 10 — **Koolhydraten, enz.**

Verschillende suikers, alkoholen, glucosieden zijn in staat, om als substraat te dienen. Hebben we bij de vorige reactie's reeds moeilijkheden ontmoet, wat betreft beoordeeling, afhankelijkheid van uitwendige omstandigheden en variatie's, hierbij treden al deze factoren nog in veel sterkere mate op. Ik zal deze daarom afzonderlijk behandelen:

De *beoordeeling* gebeurt met de gistingsbuisjes volgens Smith (1890). Hierbij zullen we echter steeds een verzadiging van de cultuurvloeistof moeten afwachten; verder kan het gasbelletje zoo minimaal klein zijn, dat we aarzelen een oordeel te vellen.

Herent men zoo'n buisje in duplo, dan treedt soms in de eene buis genoeg gas op, om de reactie pos. te rekenen, in de andere buis blijkt geheel geen gas gevormd. Door proeven met blanco buisjes en bacteriën, die zeker de bewuste suiker niet vergisten, heb ik mij een oordeel gevormd, over de hoeveelheid gas, welke zich in dergelijke gevallen kan vormen.

Afhankelijkheid van uitwendige omstandigheden. De suiker zal alleen als C bron kunnen fungeeren; nu spreekt het vanzelf, dat de vorm, waarin de benoodigde N opgediend wordt, ook een groote rol zal spelen. Meestal werd hiervoor pepton Witte gebruikt.

Voor *variatie's* zie men hoofdstuk V.

a) Glucose.

Deze hexose komt het eerst in aanmerking voor differentiatie van bacteriën der coli-typhus groep. Met uitzondering van de alkaligenesgroep, wordt glucose door alle leden snel vergist. Eberthella's (typhus, shiga, dysenterie, lankoïdes, enz.) vormen geen gas, de rest wel.

Bij mijn stammen heb ik geen moeilijkheden ontmoet; vormden de stammen binnen 3 dagen niet rijkelijk gas, dan werden ze niet verder onderzocht.

Eenige vertegenwoordigers van de IIIe en IVe groep werden nog vergeleken onder toevoeging van neutraalrood (35). Hierbij trad meestal slechts een tijdelijke geelkleuring op, zonder evenwel eenig nader licht voor een eventueele onderscheiding te geven.

Daar ik bij de bepaling van de stofwisselingsproducten (blz.

45) uitgegaan ben van glucose-krijt-pepton-water zonder NaCl, zijn eenige vergelijkende proefjes genomen, om te zien, in hoeverre zout de vergisting zou kunnen beïnvloeden. Hiertoe heb ik behalve 6 lab. stammen st. 258, 363, 456 en 98 vergeleken. Eenig verschil was niet merkbaar.

b) *Lactose.*

Ontmoetten wij bij glucose constante resultaten, bij lactose zien we het gistingsbeeld dikwijls dagelijks veranderen. Zoowel de zuurvorming, gasvorming als het reduceerend vermogen tegenover lakmoes is aan sterke schommelingen blootgesteld, zoodat de indeeling op groote moeilijkheden stuit.

Uitgegaan werd van de voorwaarde, dat binnen 48 uur broeden bij 37° C. voldoende gas gevormd moet zijn, om een bacterie tot de genera Escherichia of Aerobacter te rekenen.

De bacteriën van groep I en II zetten allen de lactose onder gasvorming in korten tijd om, ook st. 348, welke aanvankelijk wit groeit op Endo, en st. 261, welke eerst blijvend wit groeide, na een jaar evenwel roode en witte kolonie's opleverde.

De stammen der IIIe gr. vormen eerst geen gas; slechts de waterstammen kleuren de lakmoes rood in tegenstelling met de organismen uit een python, ratelslang en crocodil geïsoleerd.

St. 456, 262, 263 en 370 waren in duidelijke gasvormers over te voeren; nader op blz. 63.

In gr. IV het zelfde verschijnsel, zelfs nog wat geprononceerder. De stammen 346, 345 en 98 kleuren Petruschky blijvend rood, vormen eerst zuur uit lactose en later ook gas.

De lab. stammen ter vergelijking in lactose-pepton geënt, gaven een overeenkomstig beeld. Typische Eberthella's en Salmonella's vormen geen zuur, Paracolibacteriën mogen binnen 48 uur geen gas vormen, na 5—15 dagen waren echter allen duidelijk rood geworden onder gasvorming.

Lactose-pepton-neutraalrood in gistingsbuizen, getoetst aan organismen der eerste twee groepen gaf geen bevredigende resultaten voor differentiatie. Mijn meest typische colibacterie (st. 95) vormt eerst een duidelijk gele bovenlaag, welke na verloop van tijd weer rood wordt.

c) Proef van Eijkman.

Voor mijn indeeling heb ik deze vergisting mede als hoofddifferentiatie middel aangenomen. Die proeven werden slechts positief gerekend, waarbij voldoende gas gevormd werd.

De resultaten waren zeer constant; langdurig broeden, of herhaald overenten deed nimmer een oorspronkelijk negatieve reactie positief worden.

Zeer merkwaardig zijn de organismen van groep IV. Volgens W. C. DE GRAAFF (43) zouden dergelijke vormen niet bestaan, volgens hem zou een positieve proef van Eijkman steeds gepaard gaan met lactose-vergisting. Tevens geeft deze schrijver aan, dat een positieve reactie samengaat met een negatieve V.P. en een pos. M.R.-reactie. Een vluchtige beschouwing van mijn stammen (Tabel 3) toont reeds dadelijk aan, dat deze correlatie's volkomen fantastisch zijn. Het wateronderzoek zou er wel erg mee gebaat zijn, indien alles zoo eenvoudig ware.

Verder valt het op, dat zoovele stammen, uit koudbloedigen geïsoleerd een pos. reactie van Eijkman vertoonen. Ook onder de Proteus-achtigen (blz. 24) vinden we bij 5 van de 11 geïsoleerde stammen een pos. reactie. Ze is dus niet specifiek voor B. coli.

Al is het groote belang van Eijkman's proef dus niet gelegen in het feit, dat een bepaalde bacterie in staat is een positieve reactie te geven, toch leek het mij interessant om het gedrag der lab. stammen aan deze proef te toetsen.

Eberthella: De stammen vertoonden een duidelijke groei tijdens de proef,wat zich door een troebeling openbaarde. Na 4 weken werden de troebele buizen overgeënt. Merkwaardigerwijze was slechts de typhus-stam in leven gebleven.

Salmonella: 3 stammen waren duidelijk pos. na 24 uur. De Schottmüller-stam was iets trager en vormde slechts een spoortje gas, een Glässer stam vormde geen gas.

Paracoli: Vormden óf gas óf alleen een troebeling.

Escherichia: alle stammen gaven duidelijke pos. reactie.

Aerobacter: Van de 10 stammen vormden 4 gas, bij één was het twijfelachtig, de 5 andere gaven enkel een troebeling.

Proteus: Deze stammen, waarvan de optimum groeitemp. ook beduidend lager ligt, vormden in 3 dagen geen troebeling. Na 4

weken waren ze zwak troebel geworden. Dit is eigenlijk het eenige kenmerk geweest, wat deze zg. Proteus stammen verbond.

d) *Saccharose.*

Biedt het werken met lactose door de vele twijfelachtige resultaten vele moeilijkheden, saccharose gedraagt zich weer veel constanter en is in dit opzicht met glucose op één lijn te stellen. Ware men bij de hoofdverdeelingen van glucose en saccharose uitgegaan, dan zou men heel wat beter afgebakende afdeelingen hebben gekregen.

De beoordeeling geschiedde weer in gewone gasbuisjes onder lakmoestoevoeging. Veel zorg moet aan het steriliseeren besteed worden, opdat niet door een te hooge temp. inversie plaats vindt. Daarom verdient het ook aanbeveling, om, alvorens een nieuwe serie buizen in gebruik te nemen, deze eerst even te onderzoeken met Fehling of met een bekende stam, die zeker geen sacch. vergist.

Eigen stammen: Bij de eerste 2 groepen werden zoowel sacch. ++ als — organismen aangetroffen; stammen die alleen zuur vormden waren niet aanwezig.

Eenige correlatie met andere eigenschappen kon ik niet opmerken.

In gr. III waren alleen de 4 waterstammen sacch. ++, de anderen —, wat dus weer wijst op een nauwe samenhang met het Salmonella type.

De organismen van de IVe groep zetten geen van allen sacch. om.

Ook bij de onderzochte lab. stammen heb ik weinig twijfelachtige resultaten ontmoet. Eberthella's en Salmonella's veranderen de sacch. niet, evenmin als de meeste Escherichia stammen. Paracoli, Aerobacter, en Proteusstammen ontleden sacch. over het algemeen wel.

c) *Salicine.*

Door Levine (72), Kligler (63) e.a. is dit glucosied als differentiatie-middel ingevoerd. Salicine komt voor in de wilg (Salix). Bij hydrolyse krijgen we glucose en saligenine (ortho-oxy-benzylalkohol, $HO{\cdot}C_6H_4{\cdot}CH_2OH$).

De proefjes werden weer op dezelfde wijze als met de suikers gedaan. Opmerkelijk is de traagheid der reactie. Dikwijls is na 1 dag nog niets veranderd, na 2 dagen krijgt men een zwakke zuurvorming, na 3 dagen pas eenige gasontwikkeling, zoodat 2 dagen cultiveeren beslist te weinig is.

In alle groepen mijner stammen komen salicinevergisters voor. Slechts 2 stammen (397 en 433) vormen alleen zuur. Over het verband met de aesculinesplitsing werd op blz. 31 gesproken.

Typische Eberthella's en Salmonella's laten het glucosied onaangetast, de andere stammen vormen meest zuur of gas, dikwijls echter pas na geruimen tijd cultiveeren. De beoordeeling stuit hier op de zelfde moeilijkheden als bij lactose, misschien nog erger. Beschouwt men het resultaat na 2 en 4 dagen, dan vindt men resp. deze cijfers voor de 40 stammen:

na 2 dagen			na 4 dagen		
—	+	++	—	+	++
17	6	17	12	6	22

De beoordeeling geschiedde na 4 dagen.

f) *Dulcitol.* (*hexaanhexol*).

Alleen mijn eigen stammen heb ik tov. deze alkohol onderzocht. De beoordeeling geschiedde in kleine agglutinatiebuisjes met pepton oplossing, waaraan 1 % van het substraat, benevens wat lakmoesoplossing was toegevoegd. Gasvorming is dus, evenals bij de volgende (kostbare) stoffen buiten beschouwing gelaten.

In alle groepen werden zoowel dulcitol-pos. als -neg. organismen aangetroffen, zonder eenig verband.

g) *Adonitol.* (*pentaanpentol*).

Eenige jaren geleden heeft men, vooral in U.S.A., aan adonitol als classificatiemiddel veel waarde gehecht. (Rogers, Amerikaansche watercodex). Gegronde redenen hiervoor bleken echter niet aanwezig te zijn.

McConkey gebruikte deze alkohol voor zijn classificatie-systeem, om welke reden ik ook de stammen van mijn groepen I en II hierop onderzocht heb. Slechts 5 stammen waren in staat om zuur te vormen.

h) *Inuline.* (*polysaccharied*).

Ook inuline werd door McConkey gebruikt. Slechts één mijner stammen vergistte deze stof eenigszins.

i) *Glycerol.* (*glycerine*).

Van eenige zijden wordt de waarde van glycerol voor differentiatie in de laatste jaren bepleit. LEVINE (72) gebruikt dit substraat o.a. om B. aerogenes en B. cloacae te scheiden. BRAAK (15) onderscheidt naast B. coli een B. freundii. Deze laatste vertoont een abnormale suikervergisting en schijnt het vermogen te bezitten om glycerol onder bepaalde omstandigheden wel te vergisten.

GYÖRGY (51) hecht bij de differentiatie van zijn paracoli stammen veel waarde aan het al of niet vergisten van glycerol. Schottmüller-stammen vergisten deze stof niet, de meeste paracoli's wel.

Toepassing op de stammen van mijn beide laatste groepen gaf evenwel geen resultaat. Zoowel onder de meer naar de Escherichia-kant georienteerde paracolibacteriën uit water, als onder de Salmonella-achtigen uit slangen, trof ik glycerol-pos. en -neg. organismen aan.

De stammen 456 en 452 waren al direct na 24 uur ++, st. 98 na 48 uur. St. 435 na 3 dagen zwak zuur, na 6 dagen duidelijk gas.

De bacteriën van groep II vormen allen binnen 2 dagen gas, uitgezonderd st. 258, die hier een dag langer voor noodig heeft en st. 363, welke zuur noch gas vormt.

Voor groep I was de beoordeeling weer zeer lastig. Van de 21 bacteriën waren na 48 uur broeden 3 neg. en 3 andere zeer dubieus. Na 6 dagen waren deze allemaal duidelijk ++ geworden. Ook voor glycerol, evenals voor salicine lijkt het mij gewenscht de resultaten pas na 3—4 dagen na te gaan.

j) *Zetmeel.* (*Amylum solubile*).

Deze stof wordt zeer slecht vergist. Na 24 uur waren alle buisjes onveranderd, 2 dagen later was st. 260 zwak zuur geworden na 3 dagen st. 261 eveneens. Door langdurig verder kweeken krijgt men hier ook langzamerhand in vele gevallen een zwakke vergisting.

k) *Overige substraten.*

Andere substraten, zooals mannitol, maltose, mannose, fructose, xylose, sorbitol, raffinose, e.a. zijn eenige malen ook in het onderzoek betrokken, zonder echter resultaten op te leveren. Steeds treft men in elke groep bacteriën aan, die het wel en andere die het niet doen, zonder dat een lijn hiervoor zichtbaar wordt. Het streven, wat men tegenwoordig zoo vaak opmerkt, om steeds maar meer substraten te onderzoeken, zal. m.i. nooit een resultaat opleveren. Vinden ADAM (2) [1923] en ABRAHAM (1) [1929] in zuigelingen melk coli-bacteriën, die sorbitol toevallig niet vergisten, dan is er nog geen enkele reden, om van een „dyspepsie coli" te spreken, welke steeds sorbitol-negatief zal zijn, in tegenstelling met een „pyurie coli".

§ 11 — **Voedingsbodem volgens Endo.**

Van groot belang voor de colibacteriologie is nog steeds de Endoagar (25). Typische coli bacteriën zullen op deze zwak alkalische voedingsbodem omgestoord groeien, donker roode kolonie's vormen, welke een groen fluoresceerende metaalglans vertoonen, terwijl de agar in den omtrek rood gekleurd wordt.

Tallooze varianten treft men nu aan; zeer vele bacteriën, die in al hun andere eigenschappen met de normale B. coli overeen komen veroorzaken geen metaalglans. Ik heb niet geaarzeld dergelijke stammen toch als typische coli bacteriën te erkennen. Zoo lang men over het wezen en ontstaan van deze glans nog zoo weinig weet, lijkt mij dit verschil te gering. De roode kleur wordt hoogstwaarschijnlijk door zuren en/of aldehyd veroorzaakt, welke uit de lactose worden gevormd. Zoowel barnsteenzuur, melkzuur, azijnzuur als mierenzuur in $\pm$ 0,3 n. oplossing op Endo gebracht, kleuren dit binnen 24 uur donkerrood. Metaalglans op Endo heb ik nooit zonder bacteriëngroei kunnen constateeren. Acetaldehyd kleurt de plaat in 1 % oplossing nog duidelijk rood, 0,1 % niet meer.

Zooals blijken zal uit mijn onderzoekingen naar den aard der vergistingsproducten, die uit lactose ontstaan, groeien vooral de bacteriën, die veel barnsteenzuur vormen, kleurloos op Endo. Een zekere invloed van dit zuur heb ik echter niet kunnen aantoonen.

De verschijnselen, die men op Endoplaten waar kan nemen zijn velerlei, vooral bij een wat langdurige waarneming. In de eerste plaats zal men na 24 uur het normale coli-beeld zien verschijnen. Laat men deze platen nu een dag of 4 staan, dan is alle metaalglans verdwenen, om soms plots, op bepaalde knopjes op en in de kolonie's weer te voorschijn te komen (zeer duidelijk o.a. st. coli-kat).

In het algemeen verdwijnt de metaalglans na ca. 4 dagen.

Behalve dit kan ook de roode kleur zelf verdwijnen, bij eenigszins dicht bezaaide platen ziet men plots witte plekken ontstaan, scherp begrensd, welke zich uitbreiden en tenslotte de heele plaat kunnen ontkleuren. Brengt men een weinig materiaal van een dergelijke, ontkleurde plaat weer over op een nieuwe Endoplaat, dan zal dit de 2e plaat direct duidelijk rood kleuren (d.w.z. na 24 uur broeden).

Andere kolonie's groeien wit op Endo. Na eenigen tijd wordt deze kleur min of meer rose. Ent men zulk een rose kolonie weer opnieuw, dan zal deze weer wit groeien. Aan de rose kleur behoeft geen waarde gehecht te worden: mijn typhusstam groeide de eerste dagen duidelijk rose vergeleken bij Salmonella's en paracoli.

De aanvankelijk witte kleur kan ook langzamerhand donkerrood worden, zoodat het Endo-beeld volkomen overeen gaat stemmen, met dat van typ. B. coli. Ent men deze kolonie's over, dan blijft de kleur rood. De bacteriën hebben zich dus aangepast; in lactose-pepton gebracht wordt de suiker snel en vaak onder gasvorming vergist.

Ook plotseling kunnen zich door knopvorming op en in de witte kolonie's donkerroode vormen; een verschijnsel door Massini het eerst waargenomen en door hem met de naam: „mutatie" aangeduid. (zie blz. 60). Dit verschijnsel heb ik waargenomen bij st. 348,98 en o.a. bij 3 paracoli's en een Proteus mirabilis.

Door selectie is uit deze roode kolonie's een roode variant te krijgen, de witte kolonie's zullen steeds weer deze eigenaardige knopvorming blijven vertoonen. Deze knopjes bezitten allen duidelijke metaalglans.

Zeer bemoeilijkt worden deze waarnemingen tenslotte door uitdrogingsverschijnselen: deze doen o.a. witte knopjes ontstaan.

De stammen, welke deze knopvorming vertoonen geven in

lakmoeswei, de typische, door György aangegeven, dubbele kleuromslag. (rood → blauw → rood, blz. 26).

§ 12 — **Overzicht.**

Wat het gedrag der verschillende bacteriën tegenover de gebruikte voedingsbodems betreft, zal men opmerken bij bestudeering der tabel, dat er haast geen twee dezelfde eigenschappen hebben. Van een „atypische watercoli" kan dan ook geen sprake zijn. Dit geldt ook voor de eerste groep. Juist hiervan zijn zoovele soorten uitvoerig nagegaan, om deze afwijkingen van de typische B. coli uit te doen komen. Het is dus niet verwonderlijk, dat we bij de volgende groepen ook iets dergelijks zien.

Geen enkele eigenschap blijkt verder in aanmerking te kunnen komen om haar als differentiatie-kenmerk de voorkeur te geven boven een ander. Lactose en aanverwante media (melk, lakmoeswei, Endoplaten) zijn nog het meest aangewezen.

We zien, dat de uit water geïsoleerde stammen allen in staat zijn om uit lactose zuur te vormen.

Het is mij niet mogelijk om onze bacteriën in de bestaande classificatie systemen onder te brengen. Dit is het nadeel van alle stelsels, van Castellani en Chalmers (19), Bergey (10), Weldin (140) en, in mindere mate, ook van die van Winslow, Kligler en Rothberg (145) of Levine (72), dat we steeds bacteriën zullen vinden, die min of meer van de beschreven typen afwijken. Dit vindt men bij iedere beschrijving van meer uitgebreide onderzoekingen over Gram-negatieve staafjes, hetzij geïsoleerd bij „genito-urinary infection" (Hill c.s. (56)), „acute diarrheae" (Fothergill) (30) of indien men b.v. eenige karakteristieke kapselvormende bacteriën nader beschouwt (Small en Julianelle) (120).

De mogelijkheid bestaat nu nog, dat er verschillen zouden te vinden zijn, in de stofwisselingsproducten. Daarom heb ik van eenige typische vertegenwoordigers mijner groepen de vorming hiervan quantitatief nagegaan.

HOOFDSTUK IV.

Stofwisseling.

§ 1 — **Inleiding.**

De eerste onderzoekingen over dit onderwerp dateeren van Frankland en zijn medewerkers Fox (31) [1889], Stanley en Frew (32) [1891], Lumsden (33) en MacGregor (34) [1892].

MacFadyen, Nencki en Sieber (81) [1891] vonden bij de ontleding van glucose door B. coli aethylalkohol, azijnzuur en melkzuur; B. aerogenes vormde minder azijnzuur.

Peré (96) [1892], Blachstein (11) [1895] en Grimbert (48) [1895] meenden of vorming van melkzuur, of van barnsteenzuur te kunnen constateeren.

In 1901 verscheen de eerste publicatie van Harden (52) over de vergisting van mannitol, glucose en fructose door „Bacillus coli communis and similar organisms". Hij hoopte door deze studie tot een verbetering der classificatie te kunnen komen. Harden werkte met B. coli (gluc. ++, melk +, indol +), 6 stammen van verschillende oorsprong, 2 typhus stammen en 3 abnormale B. coli: A, B en C.

A uit cavia, stremde melk pas na 8 dagen, verder normaal.

B uit duif, idem.

C uit modder, stremde melk, vormde indol, doch geen gas.

Als gemiddelde waarden vond Harden, uitgedrukt in percenten van het gewicht der vergiste glucose:

stam	melkz.	azijnz.	alk.	barnst.	mier.	CO_2	H_2
B. coli	48	16,5	12	5,5	0,5	14,7	0,8
typh.	40	14	10	1	17,5	—	—
A	33	21	14	3	1	2,9	
B	25	25	20	4	3	3.6	
C	77	14	5	3	9	—	—

Tellen we de percentages op, dan vinden we resp. 91, 83, 75, 81 en 108. Een absoluut juiste voorstelling krijgen we door deze sommatie's niet, daar we nooit weten, in hoeverre H_2O

moleculen een rol spelen, maar een oriëntatie is het zeker.

Over bijzonderheden omtrent de wijze, waarop Harden en zijn medewerkers zich de vorming dezer stoffen, vooral barnsteenzuur, uit de suikers ontstaan dachten, verwijs ik naar het proefschrift van SCHEFFER (115).

Van de hand van HENRI POTTEVIN (101) verscheen in 1905 een: „Contribution à la bactériologie des Gastro-Entérites infectueuses". Hij vulde glazen ballonnen met bouillon, krijt en het toe te voegen substraat (glucose, mannitol of glycerol), daarna werd de kolf luchtledig gepompt en 3—30 dagen bij 33° C geplaatst. Voor zijn analyses paste hij o.a. de gefractioneerde destillatie van Duclaux toe. Hij vergeleek t.o.v. glucose eenige Salmonella's en vond een zeer gelijkmatig beeld:

alkohol:	7—10 %	melkz.:	65—69 %
azijnz.:	6—11 %	barnst.:	5— 7 %

THOMPSON (134) [1912] toonde aan, dat B. cloacae in principe hetzelfde beeld geeft als B. aerogenes.

GREY (44) publiceerde in 1914 zijn eerste arbeid over de ontleding van glucose en mannitol door B. coli. Hij vergeleek normale stammen met de variëteiten, die ontstaan door cultiveeren in $CH_2Cl.COONa$-houdende vloeistoffen, („selected") volgens Penfold (95) (zie blz. 57).

Eigenschappen der stammen:

CI normaal.

CF vormde iets minder indol, bewegelijkheid twijfelachtig.

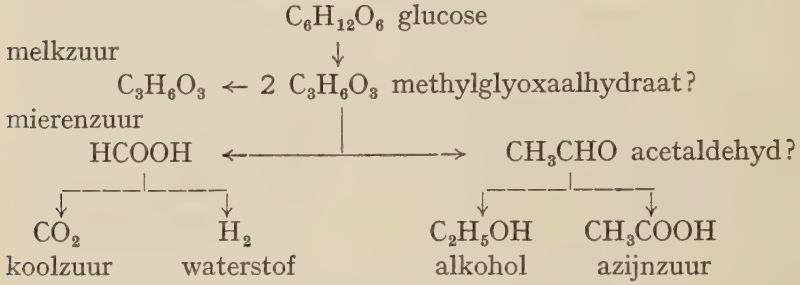
Hij vond onderstaande waarden:

	CI	CIsel.	CF	CFsel.
CO_2	15	2	17	0
H_2	0,5	0,1	0,5	0
mier.z.	3	15	10	12
azijnz.	13	6	18,5	10
melkz.	38	60	37	62
barnst.	4	5,5	1	1
alkoh.	12	5	18	5
	86	93	91	90

Bij CI „selected" werd dus meer mierenzuur en melkzuur gevormd, bij CF sel. was alleen de hoev. melkzuur sterk toegenomen.

De hoeveelheden azijnzuur en alkohol zijn in beide gevallen afgenomen, barnsteenzuur is hetzelfde gebleven; ook dit wijst er op, dat dit zuur denkelijk onafhankelijk van de andere stofwisselingsproducten gevormd zal worden. (vgl. SCHEFFER) (115).

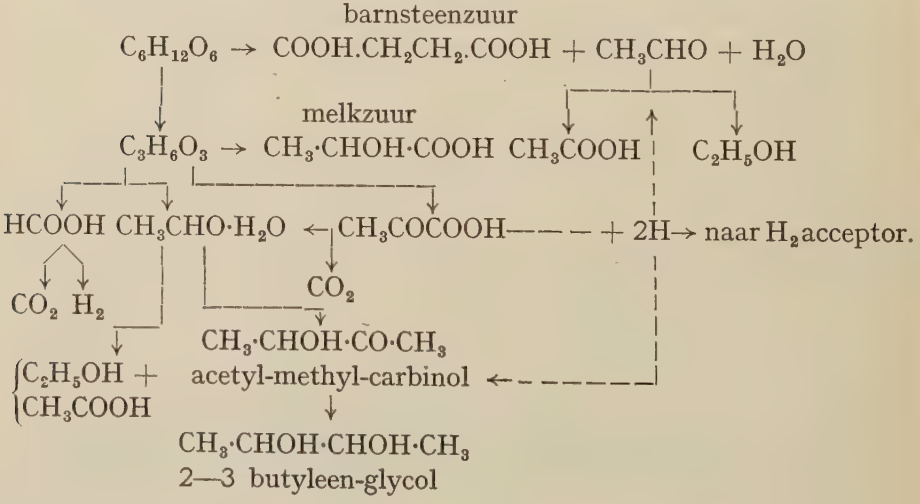
GREY geeft als meest waarschijnlijk vergistingsschema:



Om van de assimilatie producten af te komen, werkt Grey (45) in 1919 met geconcentreerde suspensie's van coli bacteriën (1 gr. vergist in 48 uur 40 gr. suiker), ook thans bleek groei niet uit te sluiten (46).

SCHEFFER (115) gaat aan de hand van quantitatieve „gistingsbalansen" de dissimilatie-producten na, en wel voor 2 mogelijkheden, n.l. het barnsteenzuur direct uit glucose, of uit intermediair gevormd acetaldehyd ontstaan denkend.

Als de meest waarschijnlijke voorstelling voor de vergisting van coli-achtigen geeft hij volgend schema:



Hierbij is afgezien van, meest hypothetische, tusschenproducten en werkelijk kunnen met dit schema alle omzettingen van glucose door Eberthella, Salmonella, Escherichia en Aerobacter zeer bevredigend verklaard worden.

Het was niet te verwachten, dat atypische coli-achtigen hiervan zouden afwijken. Voor eenige stammen heb ik dit nagegaan en het bleek ook, dat zij volkomen in dit schema pasten.

Daar we vooral tov. lactose zulke merkwaardige afwijkingen constateeren, leek het interessant, om ook van deze suiker eens quantitatief de dissimilatie na te gaan. Na GRIMBERT (48) [1895] heb ik in de litteratuur geen onderzoekingen hiermede meer kunnen vinden.

§ 2 — Gebruikte analyse-methoden.

Daar we uitgaan van de te onderzoeken suiker in een peptonmedium opgelost, onder toevoeging van $CaCO_3$ en we als dissimilatieproducten kunnen verwachten: CO_2, H_2, azijnzuur, aethylalkohol, barnsteenzuur, melkzuur, mierenzuur en mogelijk acetylmethylcarbinol en 2-3 butyleenglycol, lijkt mij een nadere uiteenzetting van de gebruikte methode's niet overbodig.

De proeven heb ik steeds gedaan in Erlenmeyer kolven van 1 liter inhoud. Deze werden gevuld met een 1 % oplossing van pepton Witte in leidingwater, zonder zouttoevoeging.

De kolven werden gesloten met een rubber stop, waardoor een lange buis om koolzuur-vrije lucht te kunnen doorleiden, een trechtertje om bacteriënmateriaal in de kolf te brengen en een buisje om de gevormde gassen af te voeren, alle drie van kranen voorzien. De kolf en stop met appendices werden afzonderlijk gesteriliseerd en dan op elkaar geplaatst. De kolven waren nagenoeg geheel gevuld.

Daar vooral SCHEFFER (115) zeer veel waarde aan een streng anaeroobe omgeving voor de gistingen hecht en hieraan o.a. de afwijkende waarden wijt, die LEFÈVRE (28) voor B. coli heeft gevonden, heb ik naast elkaar door de zelfde atypische colibacterie lactose laten vergisten met en zonder uitsluiting der zuurstof. De eerste kolf werd daartoe na sterilisatie onder het doorleiden van N_2 (bevrijd van mogelijke spoortjes O_2 door pyrogallol en kali), de tweede onder luchtdoorleiding afgekoeld.

Na een week werden de hoeveelheden verbruikte lactose en gevormde vergistingsproducten nagegaan:

	N_2 atmosfeer		lucht	
	gr.	%	gr.	%
alkohol	0.530	17.6	0.530	18.2
azijnzuur.	0.920	30.3	0.874	30.0
mierenz.	0.026	0.9	0.025	0.9
brnst.z.	0.959	32.2	1.060	36.4
melkzuur	0.467	15.5	0.342	11.8
totaal	2.902	96.5	2.831	97.3
verbr. suiker	3.008		2.908	

De invloed van de zuurstof is dus zeer gering (vgl. GREY) (47).

Bij de overige proeven werden geen speciale voorzorgen genomen om de zuurstof uit te sluiten.

De kolven werden steeds in een thermostaat van 37° C. gebracht.

a) *Gassen.*

De koolzuurbepaling geschiedde door het ontwijkende gas door twee waschfleschjes met kaliloog te laten strijken. Voor en na de proef werd geruimen tijd CO_2 vrije lucht doorgeleid. Uit titratie voor en na de proef met methyloranje en ook met fenolftaleïne na toevoeging van $BaCl_2$, volgt de hoeveelheid gebonden koolzuur.

Het overblijvende gas werd boven een verzadigde pekeloplossing opgevangen, gemeten en als waterstof berekend.

b) *Vluchtige neutrale stoffen.*

De gistingsvloeistof werd eerst grootendeels van het krijt bevrijd en aangevuld tot 500 cc.; 200 cc. hiervan werden gedestilleerd tot $^3/_5$ deel over was gegaan, die weer aan een hernieuwde destillatie onderworpen werden, totdat precies 100 cc. verkregen was.

Tijdens het eerste begin der destillatie kan men alkohol reeds op het oog herkennen door het eigenaardig condensaat in den spatbol.

Van de 100 cc. werd pyknometrisch het s.g. bepaald, waaruit direct het alkoholgehalte volgde, daar andere stoffen steeds afwezig bleken. Er werd gereageerd op alkhohol, aceton, aldehyden, ammoniak, aminen en acetyl-methyl-carbinol volgens de bekende methoden.

c) Vluchtige zuren.

Het residu van de eerste destillatie, dus 200 cc., bevatte de Ca zouten van de vluchtige zuren, azijn- en mierenzuur. Door neutralisatie met oxaalzuur werden de zuren juist in vrijheid gesteld, het Ca-oxalaat door filtratie verwijderd en het filtraat in een Kjeldahlkolf aan stoomdestillatie onderworpen, tot 1,5 L. over was gegaan. Contrôle-proefjes bewezen, dat dan 1—2 druppels n/10 loog voldoende waren, om 10 cc. destillaat te neutraliseeren. Een volkomen neutraliteit wordt nooit bereikt; dit komt, omdat er na verloop van eenigen tijd steeds melkzuur mee overgaat. Door SMIT (123) is dit in 1913 al overtuigend aangetoond, en daarom zijn alle analysen, die het azijnzuur door substractie bepalen, te verwerpen. Dit overgestoomde melkzuur kan dergelijke hoeveelheden bedragen, dat de fout 14,4 % kan zijn bij de azijnzuur bepaling.

$^1/_3$ Deel van dit stoomdestillaat werd geneutraliseerd op fenolftaleïne en hierin het mierenzuur volgens de methode van Fincke bepaald.

De rest, 1 liter, werd van de dubbele hoeveelheid loog voorzien en ingedampt tot een gering volume, de noodige cc. zuur toegevoegd om de zuren weer in vrijheid te stellen, tot 110 cc. aangevuld en volgens de methode van DUCLAUX (23) aan gefractioneerde destillatie onderworpen. Hiermee bereikt men in de eerste plaats een nauwkeuriger azijnzuurbepaling, immers 80 % gaat hiervan over en verder blijkt uit het verloop der krommen dadelijk, of hoogere vetzuren aanwezig zijn.

Azijnzuur kan buitendien nog steeds volgens de kakodyl-reactie worden aangetoond. Hoogere vetzuren zijn nooit gevonden.

Een uitvoerige uiteenzetting van de methode van DUCLAUX vindt men beschreven door SMIT (123), die o.a. vond, dat melkzuur een zeer geringe invloed uitoefent op de vluchtigheid van azijnzuur en mierenzuur, zoowel op ieder afzonderlijk als op een mengsel.

Daar uit mijne proeven zal blijken, dat er in sommige gevallen groote hoeveelheden barnsteenzuur gevormd werden, diende nagegaan te worden, welke invloed dit zuur op de bepaling kon hebben. Daartoe werden oplossingen bereid, van barnsteenzuur en azijnzuur, welke zoo sterk waren, dat

10 cc. barnsteenzuur = 33,9 cc. n/10 loog.
10 cc. azijnzuur = 37,7 cc. n/10 loog.

Het azijnzuur bleek per 10 cc. nog 0,9 m.gr. mierenzuur te bevatten, zoodat hiervoor 0,2 cc. afgetrokken dient te worden.

De blanco bepaling met 10 cc. barnsteenzuur opl., aangevuld tot 110 cc. en gefractioneerd gedestilleerd, bewees, dat er geen vluchtig zuur mee over ging. Eén druppel n/10 loog was voldoende, om het geheele destillaat duidelijk rood te kleuren met fenolftaleïne als indicator.

De proeven met azijnzuur en wisselende hoeveelheden barnsteenzuur zijn vereenigd in onderstaande tabel, aangegeven als percentage's reeds overgegaan zuur op de totale hoeveelheid vluchtig zuur. De laatste tabel bevat de waarden door Duclaux voor zuiver azijnzuur gevonden.

Fractie	10 cc.az 0 cc.b	10 cc.az 10 cc.b	10 cc.az 30 cc.b	10 cc.az 50 cc.b	Duclaux v. azijnz
1	7.7	7.8	7.7	8.0	7.4
2	15.9	15.8	16.2	15.9	15.2
3	24.1	24.2	24.2	24.2	23.4
4	32.8	32.8	32.9	32.9	32.0
5	41.8	42.0	41.8	41.8	40.9
6	51.7	51.7	51.8	51.8	50.5
7	61.8	62.0	61.9	62.0	60.6
8	73.2	73.3	73.0	73.3	71.9
9	85.4	85.5	85.6	85.6	84.4
10	100	100	100	100	100
tot. hoev. zuur in de 10 fr.	29.95	30.00	29.8	30.15	
berekend aant. cc. azijnz.	37.5	37.5	37.3	37.7	
oorspr. aanw. aant. cc. az.	37.5	37.5	37.5	37.5	

Van een storende invloed van het barnsteenzuur is dus niets te merken. Wel valt het op, dat mijn waarden allen ongeveer 2 % hooger zijn dan die van Duclaux. Mogelijk komt dit, door een gewijzigde opstelling, daar het destillatie toestel van Polenske gebruikt werd, zooals dit voor het onderzoek van vetten algemeen toegepast wordt (KNETEMAN) (65).

d) Niet-vluchtige zuren.

Daar met de stoomdestillatie steeds melkzuur mee overgaat, heb ik er de voorkeur aan gegeven, om 50 cc. der oorspronkelijke vloeistof even op te koken, dan sterk aan te zuren met H_2SO_4 en met aether te extraheeren ;24 uur bleek voldoende ; emulsievorming werd volkomen onschadelijk gemaakt, door een propje watten, waardoor de aether heen moest, om weder in het kolfje te geraken.

Het residu, na afdamping van den aether, kon opgenomen worden in alkohol. Het barnsteenzuur werd dan neergeslagen in kokende oplossing met $Ba(OH)_2$, (toevoegen tot fenolftaleïne rood wordt) en gewogen. Het filtraat bevat dan nog het melkzuur, wat na verwijdering der alkohol in sterk alkalische oplossing met $KMnO_4$ geoxydeerd werd tot oxaalzuur. Dit is op de bekende methoden direct te bepalen. Nadat het Ba-succinaat gewogen was, werd hiervan wat op een horloge glas gebracht, wat zuur toegevoegd en dan boven een klein vlammetje het barnsteenzuur op een ander glas gesublimeerd. Dit sublimaat is, vooral microscopisch zeer karacteristiek; microchemisch kan men zich nog overtuigen met loodacetaat-reagens, waarmede eigenaardige, ruitvormige kristalletjes ontstaan.

Ook het melkzuur is microchemisch te herkennen door de zeshoekjes, die zich met $Co(NO_3)_2$ vormen.

§ 3 — **Vergisting der glucose door bacterien der Ie groep.**

Allereerst heb ik de normale darmcolistam 95 onderzocht. Deze voldoet immers het beste aan de eischen door de meeste onderzoekers aan de typische B. coli gesteld. De gisting verliep normaal, evenals bij st. 348, welke als de atypische vertegenwoordiger dezer groep uitgekozen werd. De toegevoegde glucose bleek nagenoeg geheel verbruikt, n.l. voor 98 % in beide gevallen.

De uitkomsten vindt men vermeld in onderstaande tabel:

glucose	stam 95		stam 348	
	grammen	%	grammen	%
H_2	0.07	0.8	0.07	0.8
CO_2	1.47	18.1	1.67	18.9
alkohol	0.65	7.4	0.79	8.9
azijnzuur	1.37	15.5	1.86	21.1
mierenzuur	0.08	0.9	0.06	0.7
barnsteenzuur	0.71	8.0	0.48	5.5
melkzuur	3.91	44.3	3.44	38.9
totaal	8.38	95.0	8.37	94.8
verbruikte suiker . .	8.82	98.0	8.85	98.4
toegevoegde suiker. .	9.00		9.00	

Ook st. 348 vertoont dus het normale beeld van de gemengdzure gisting. Ongeveer 20 % van de gebruikte glucose wordt in beide gevallen in gasvormige producten omgezet, waarvan de verhouding H_2:CO_2 resp. 1.04 en 0.92 is, dus sterk tot 1 nadert.

§ 4 — **Vergisting der glucose door bacterien van groep II.**

Ook hiervan werden 2 vertegenwoordigers onderzocht. De keuze viel op st. 258, uit grachtwater geïsoleerd en st. 363, van dierlijken oorsprong (slak). De eerste stam vormt geen indol, beiden zijn V.P. —, M.R. +. Daar de vloeistof van Eijkman niet vergist wordt, zou men een afwijkende glucose vergisting kunnen verwachten.

glucose	stam 258		stam 363	
	grammen	%	grammen	%
H_2	0.03	0.6	0.04	0.8
CO_2	0.09	1.8	0.93	19.5
alkohol	0.13	2.6	0.46	9.7
azijnzuur	0.63	13.1	0.99	20.8
mierenz.	0.05	1.0	0.04	0.8
brn.z.	0.32	6.7	0.39	8.2
mlk.z.	3.54	74.5	1.80	37.8
totaal	4.79	100.3	4.65	97.6
verbr.s..	4.76	100	4.76	100
toeg.s.	4.76		4.76	

Terwijl st. 363 zich normaal gedraagt en weinig verschil in stofwisseling vertoont met b.v. st. 348, geeft st. 258 een geheel ander beeld. Door een duplo bepaling heb ik mij overtuigd van de juistheid der analyse.

Voor $^3/_4$ wordt de suiker in melkzuur omgezet, een hoeveelheid, die ik bij geen andere stam heb kunnen terugvinden. Dergelijke percentage's vindt men anders alleen bij niet-gasvormende bacteriën dezer groep. Nu is de gasvorming bij deze stam wel zeer abnormaal. De verhouding H_2:CO_2 bedraagt 7.27, terwijl deze verhouding, gezien de onnauwkeurigheid der CO_2 bepaling, bij deze geringe hoeveelheid koolzuur, nog wel grooter zou kunnen zijn.

§ 5 — Vergisting der glucose door bacterien van groep III en IV.

Ook hier is alleen de gistingsproef van Eijkman de scheidende factor tusschen beide groepen. In tegenstelling met lactose wordt glucose steeds krachtig, onder rijkelijke gasvorming vergist.

Van groep III werd stam 456, uit grachtwater, onderzocht, van de laatste groep st. 98, die we in water, door menschelijke faeces verontreinigd zouden kunnen aantreffen.

glucose	stam 456		stam 98	
	grammen	%	grammen	%
H_2	sp.	—	0.13	1.5
CO_2	2.80	29.0	2.55	27.8
alk.	2.51	26.0	1.02	11.2
az.z.	0.81	8.4	1.77	19.3
mier.z.	0.02	0.2	0.09	1.0
brnz..	0.64	6.6	1.23	13.4
mlk.z.	2.84	29.4	2.14	23.4
totaal	9.62	99.6	8.93	97.6
verbr.s.	9.67	98.7	9.15	93.3
toeg.s.	9.80		9.80	

Stam 456 vormt nagenoeg geen waterstof; met bijzondere zorg heb ik nogmaals een duplobepaling aangezet, doch evenmin

dit gas kunnen aantoonen. Ook de mierenzuur-vorming is buitengewoon gering en mogelijk afkomstig uit het pepton of melkzuur.

Het methyl-glyoxaal-hydraat (zie blz. 44) zal hier dus alleen tot pyrodruivenzuur gesplitst worden. Dit geeft CO_2 + acetaldehyd + 2H. Dit acetaldehyd zal als H-acceptor optreden en we zullen dus beduidend meer alkohol dan azijnzuur kunnen verwachten. Dit blijkt ook werkelijk het geval.

St. 98 geeft weer een normaler beeld van B. coli. Verhouding $H_2 : CO_2 = 1.13$. De gasvorming is wat sterker, evenals de barnsteenzuurvorming, beide ten koste van het melkzuur.

§ 6 — **Vergisting der lactose door bacterien van groep I.**

Met het oog op de groote veranderingen, die men in de lactosetiter ziet optreden, is het van veel belang om te zien, wat er eigenlijk met de lactose geschiedt. Van alle groepen heb ik daartoe 2 vertegenwoordigers onderzocht en wel de zelfden, welke alreeds op glucose zijn getoetst.

Voor de stammen 95 en 348 krijgen we dit beeld:

lactose	stam 95		stam 348	
	gr.	%	gr.	%
H_2	0.009	0.1	0.007	0.1
CO_2	0.56	6.9	0.38	5.9
alk.	0.91	11.2	0.65	10.1
azijnz.	1.77	21.9	1.18	18.3
mier.z.	0.06	0.7	0.05	0.8
brn.z.	0.67	8.3	0.89	13.9
melk.z.	4.02	49.8	3.10	48.2
totaal	8.00	98.9	6.26	97.3
verbr.s.	8.09	85.3	6.43	67.8
toeg.s.	9.48		9.48	

Beide stammen vormen voor de helft melkzuur uit de vergiste lactose, daarnaast alkohol, azijn- en barnsteenzuur, st. 348 van dit laatste vrij veel. De gasvorming is gering in vergelijking met glucose als substraat. Verhouding $H_2 : CO_2$ resp.: 0,03 en 0,04.

§ 7 — **Vergisting der lactose door bacterien van groep II.**

Een groot verschil met bacteriën der Ie groep kunnen we niet verwachten, hoogstens een ietwat trager gedrag.

Weer werden de stammen 363 en 258 onderzocht. De gistingen verliepen inderdaad minder krachtig, gasvorming was minimaal. De analysen bevestigen deze waarnemingen volkomen:

lactose	stam 363		stam 258	
	gr.	%	gr.	%
H_2	0.004	0.1	—	—
CO_2	0.23	3.6	0.08	1.8
alk.	0.84	13.0	0.72	16.6
azijnz.	1.33	20.7	0.90	20.5
mier.z.	0.04	0.7	0.03	0.8
brn.z.	0.62	9.7	0.65	14.9
melkz.	3.34	51.8	1.98	45.5
totaal	6.40	99.4	4.36	100.1
verbr.s.	6.44	67.9	4.36	46.0
toeg.s.	9.48		9.48	

Van de toegevoegde lactose wordt dus resp. slechts 68 en 46 % vergist, terwijl de gasvorming zeer gering is, vooral bij de 2e stam. Verhouding H_2 : CO_2 bij stam 363 is 0.04, dus van de zelfde grootte als bij de bacteriën der eerste groep. De andere waarden zijn hiermee ook in goede overeenstemming: de helft ongeveer melkzuur, 20 % azijnzuur en verder alkohol en barnsteenzuur.

Een nadere beschouwing van de vier, tot nogtoe onderzochte, stammen geeft ons een verschillend gedrag tegenover melk. St. 95 en 363 brengen deze in één dag volledig tot stremming; de stammen 348 en 258 hebben hier eenigen tijd voor noodig. Deze laatste stammen vormen nu een belangrijke hoeveelheid barnsteenzuur uit lactose. Om een mogelijk verband tusschen de barnsteenzuurvorming en het uitblijven der melkstremming na te gaan, voegde ik aan steriele melk, alvorens te enten, (met st. 95), kleine hoeveelheden barnsteen-, azijn- en melkzuur toe; zoowel afzonderlijk als gemengd. Na 24 uur cultiveeren bleken

evenwel de buizen met barnsteenzuur en melkzuur, evenals de blanco bepaling, volledig gecoaguleerd. Azijnzuur werkte eenigszins vertragend, na 48 uur, waren evenwel ook deze buizen gestremd.

§ 8 — **Vergisting der lactose door bacterien van groep III.**

In deze groep ontmoeten we bacteriën, die, geënt in lactose pepton, hieruit zuur kunnen vormen, of hiertoe niet in staat blijken. Deze laatste vallen hier buiten beschouwing, zoodat in aanmerking kwamen 4 stammen, 456, 452, 262 en 263; uit grachtwater geïsoleerd. De st. 456 en 263 nader onderzocht. Gasvorming (H_2) bleef achterwege.

Resultaat:

lactose	stam 456		stam 263	
	gr.	%	gr.	%
H_2	—	—	—	—
CO_2	—	—	—	—
alk.	0.23	5.5	0.52	9.2
azijnz.	1.29	31.7	1.10	20.3
mier. z.	0.02	0.6	0.04	0.7
brn.z.	1.98	48.6	2.37	43.8
melkz.	0.25	6.2	1.34	24.8
totaal	3.77	92.6	5.37	98.8
verbr.s.	4.08	43.1	5.41	57.0
toeg.s.	9.49		9.49	

Het meest opvallend bij deze analysen is wel, de enorme hoeveelheid barnsteenzuur, die zich heeft gevormd. Dit is dus in overeenstemming met de waarnemingen van Grimbert. St. 263 vormde tevens een spoortje acetyl-methyl-carbinol.

De hoeveelheden vrijgemaakt (berekend uit de hoeveelheid gevormd zuur) en gevonden (getitreerd) koolzuur bedraagt in beide gevallen resp. 1.29—1.24 gr. en 1.63—1.67 gr. hetgeen dus een goede controle geeft op de juistheid der analyses en tevens een beeld, van de nauwkeurigheid, die we bij de andere CO_2 bepalingen kunnen verwachten.

Beide stammen stremmen de melk pas na ± 10 dagen; de zuurvorming uit lactose is toch vrij aanzienlijk, zoodat het barnsteenzuur hier mogelijk een rol zou kunnen spelen. Ook tegenover de voedingsbodem van Endo lijkt het vreemd, dat deze stammen hierop wit groeien. Het al of niet rood worden zal dus niet alleen van de zuurgraad afhangen, ook andere factoren zijn hierbij in het spel.

Naast het barnsteenzuur moet volgens SCHEFFER (115) steeds een aequivalente hoeveelheid acetaldehyd gevormd worden. Indien de roode kleur op Endo hierdoor alleen veroorzaakt werd, zou deze laatste stof zeker rijkelijk voorhanden zijn. Ook aan de voorwaarde: aldehyd + zuur is voldaan. De platen blijven evenwel wit.

Een dergelijke proef als met melk en verschillende hoeveelheden en mengsels barnsteen-, melk- en azijnzuur op buisjes met schuine Endo agar toonde geen enkele invloed aan; allen werden op de zelfde wijze rood.

§ 9 — **Vergisting der lactose door bacterien van groep IV.**

Ook hiervoor heb ik de stammen 346 en 98 nader onderzocht. Is st. 346 volkomen te vergelijken met de twee onderzochte stammen van groep III, st. 98 wijkt af naar het mutabile-type van Massini. Op den duur vormt hij uit lactose zelfs gas en bij mijn proef, die steeds zoowat één maand duurde, is 10 % der lactose in gas omgezet. Analyse:

lactose	stam 346		stam 98	
	gr.	%	gr.	%
H_2	—	—	0.003	0.1
CO_2	—	—	0.61	10.7
alk.	0.38	10.0	1.18	20.8
azijnz.	0.76	20.4	1.44	25.4
mier.z.	0.03	0.8	0.06	1.0
brn.z.	1.91	51.0	1.21	21.4
melkz.	0.40	10.8	1.04	18.3
totaal	3.48	93.0	5.54	97.7
verbr.s.	3.75	39.5	5.67	59.7
toeg.s.	9.49		9.49	

St. 346 sluit zich volkomen aan bij de 2 stammen uit gr. III. Meer dan de helft is hier zelfs in barnsteenzuur omgezet. Ook st. 98 heeft nog meer dan 20 % van dit zuur gevormd. Verhouding $H_2 : CO_2 = 0{,}05$, dus van de zelfde groote-orde als bij de stammen der eerste twee groepen. De gasvorming bij st. 98 begon pas na eenige dagen.

§ 10 — **Overzicht.**

De vergisting der glucose vertoont voor de normale B. coli het zelfde beeld, als door andere onderzoekers gevonden is. De waarden zullen steeds binnen zekere grenzen schommelen, zoolang we niet met de zelfde stam werken en m.i. zullen twee stammen van verschillenden oorsprong wel nooit volkomen de zelfde getallen opleveren. Een andere stam van groep I (st. 348), welke, behalve door zijn witte groei op Endoagar, ook nog in vele andere eigenschappen (o.a. sacch. ++, dulc. —) afwijkt van het B. coli commune type, komt in zijn stofwisseling hiermee echter zeer overeen.

Eén der onderzochte stammen van groep II (st. 363) onderscheidt zich evenmin van de vorigen. Een totaal ander beeld geeft evenwel st. 258, zonder dat ik hiervoor een reden kan vinden. Dit zelfde geldt ook voor st. 456 uit groep III; st. 98 (gr. IV), nadert weer meer tot B. coli.

De vergisting der lactose scheelt ook voor de beide typen uit gr. I en st. 363 gr. uit II weinig. Opvallend is de kleine waarde van de verhouding der hoeveelheden H_2 en CO_2, nl.: 0,03—0,05; de helft der suiker wordt in melkzuur omgezet.

Naarmate een stam meer atypisch wordt, ziet men, dat de hoeveelheid barnsteenzuur toeneemt en het merkwaardigste resultaat van deze onderzoekingen is wel, dat de bacteriën van gr. III en IV zulke groote hoeveelheden barnsteenzuur uit lactose kunnen vormen, dat men ze terecht als barnsteenzuur-bacteriën zou kunnen beschouwen. De vergisting is evenwel slecht, zoodat de totale hoeveelheid zuur vrij gering blijft.

Bij st. 98 neemt de hoeveelheid van dit zuur weer af; deze stam is dan ook in een haast normale colibacterie over te voeren, zooals uit het volgende hoofdstuk zal blijken.

HOOFDSTUK V.

Variabiliteit.

§ 1 — **Inleiding.**

Nergens treedt de veranderlijkheid zoo sterk naar voren, als juist bij de fermentatiereactie's. We zien zoowel het verlies van het vermogen om een bepaalde stof te ontleden, al of niet onder gasvorming, als ook het verkrijgen van deze eigenschap. Daar de suikerreactie's het hoofdkenmerk vormen bij de classificatie-systemen der coli-typhusgroep, zou men zich hier bijv. de mogelijkheid van een overgang van een Salmonella in een Escherichia kunnen denken. Wij zouden ons kunnen afvragen, of uit een onschuldige B. coli een paratyphusachtige zou kunnen ontstaan, of misschien wel een echte typhus. In de litteratuur vindt men ook werkelijk eenige van deze overgangen vermeld, zonder dat deze echter ooit bevestigd zijn geworden.

§ 2 — **Verlies van eigenschappen.**

Bij proeven over het verlies van bepaalde eigenschappen zullen we steeds de uitwendige omstandigheden scherp in het oog moeten houden. Toevoeging van bepaalde chemische stoffen aan een cultuur-medium, vooral van antiseptica, blijkt veelal gepaard te gaan met het verlies van eenige biochemische eigenschappen.

Herter (55) [1909] voegde 0,1 % Na benzoaat toe, de coli bacteriën werden hierdoor gluc. —.

Penfold (95) [1912] liet B. coli en B. acidi lactici groeien in tegenwoordigheid van het Na zout van monochloor-azijnzuur ($CH_2Cl{\cdot}COONa$). De stammen verloren alle gasproduceerende eigenschappen bij de suikers; tegenover alkoholen bleven deze evenwel constant. Ook voor paratyphus-achtigen vond Penfold een dergelijk gedrag. Grey heeft de stofwisselingsproducten dezer

stammen, „selected coli", vergeleken met de oorspronkelijke.

Revis (108) [1911] liet B. coli groeien op platen, die 0,03—0,15 % malachietgroen bevatten; het gasproduceerend vermogen verdween ook hier en tenslotte werd in dulcitol zelfs geen zuur meer gevormd. Bij B. aerogenes waren de veranderingen slechts gering.

Smirnow (121) [1916] voegde $\frac{1}{4}$-$\frac{3}{4}$ % fenol toe, en merkte daarbij een geleidelijke vermindering der activiteit op. Eerst verdween de indolvorming, dan de gasproductie in de verschillende media, de coagulatie van melk en ten slotte de zuurvorming.

Kunnen we bij deze gevallen een agens opgeven, waardoor we deze afwijkingen krijgen, bij andere proeven gaat dit niet meer.

Ter Poorten (100) [1920] verkreeg door kweeken van normale B. coli in weefselvocht (collodium-zakjes in konijnen) een vermindering van het lactose vergistend vermogen. Op Endo groeiden deze bleek.

Tenbroeck (133) [1916] vond bij een normale S. suipestifer een variant, welke uit glucose geen gas meer vormde.

Van meer belang voor dit werk zijn de onderzoekingen over het verlies of de verzwakking van de eigenschappen, welke optreden bij het langdurig bewaren van bacteriën in water; veel is hier niet over bekend:

Kiefer (62) [1922] onderzocht 2 colistammen, die 18 jaren op agar in toegesmolten glazen buisjes bewaard waren: de indolvorming was zeer zwak geworden en op Endoagar kon hij de bacteriën, zelfs na herhaalde overentingen, niet meer tot groei brengen.

Peckham (93), Konrich (66), Refick (106), Blumenberg (12) e.a. zagen B. coli door langdurig verblijf in water atypisch worden en wel door het verlies van het vermogen om indol te vormen. Schroeder (116) kon geen quantitatieve verandering in de hoeveelheid gevormd zuur uit lactosebouillon voor en na bewaren aantoonen, wel in de hoeveelheid gas.

Sachse (111) [1916] vond ook een vermindering van het vermogen om gas te produceeren, evenals Henningsson (54) [1913].

De variabiliteit der indolvorming wordt bestreden door Rivas (110) [1907], Savage (114) [1906], Neisser (88) [1928].

Holwerda (59) [1928] kon bij coli-achtige organismen, na een bijna 3-jarig verblijf in steriel rivierwater, vrijwel geen verschil tusschen de glucose- en Eijkmantiters constateeren.

Prell (102) [1917] kon uit mengculturen van B. coli en B. typhosum paracoli- en mutabilestammen verkrijgen. Op lactosevrije media lieten zich uit normale B. coli lactose-negatieve pleonten afscheiden.

§ 3 — **Winst van eigenschappen.**

Veel meer is het andere geval gevonden, dat suikers, die eerst niet werden aangetast, later gretig geconsumeerd werden. Het aantal voorbeelden is zoo groot, dat ik me slechts tot enkele zal moeten beperken.

Klotz (64) [1906] isoleerde coli-achtigen, welke eerst geen saccharose en lactose omzettend, dit later wel deden, onder gasvorming zelfs.

Twort (138) [1907] probeerde modificatie's te verkrijgen, door een langdurig verblijf der bacteriën in de betreffende suiker. In 2 jaar kreeg hij uit typhus-bacteriën lactose vergistende, soorten, die ook dulcitol aantastten, terwijl de stammen agglutinabel bleven. Binnen 24 uur waren dysenterie-bacteriën van het Kruse- en Flexner-type in staat saccharose te vergisten; alle paratyphus-achtigen bleken ook hiertoe min of meer in staat. Kuwabara (69) [1907—1909], Bull en Pritchett (16) vonden door typhusserum sterk agglutinabele coli-achtigen.

Verdere onderzoekingen hierover met Eberthella en Salmonella zijn beschreven door Hiss (57), Bock (13), Penfold (94) Oliver en Perkins (90).

Arkwright (3) [1913] isoleerde uit de urine van een patient gedurende 11 maanden maar één bacterie van het type B. acidi lactici (sacch. en dulc. —, ind. +). Hij kon 2 variëteiten onderscheiden. Hoewel agglutinatorisch volkomen gelijk, kon de eerste zoowel gas als zuur, de andere alleen zuur uit suikers vormen. Deze laatste kreeg zijn gasvormend vermogen weer terug, vooral onder invloed van een weinig Na formiaat.

Naast deze geleidelijke overgangen treffen we meer plotselinge sprongen aan. Massini (83) beschrijft in 1907 „eine interessante

Kolistamm" welke de eerste 2—3 dagen kleurloos op Endo groeiend, plots donkerroode knopjes vertoonde. Hij noemde deze bacterie B. coli mutabile (onbewegelijk, melk na 8—10 dagen gecoaguleerd, lakmoeswei: rood, gel. —, ind. —, sacch. —) spreekt van dochterkolonie's, en verklaart het verschijnsel met behulp van Hugo de Vries' mutatie theorie.

Door talrijke onderzoekers zijn de waarnemingen van Massini bevestigd, ook kon ik zelf bij eenige stammen deze verschijnselen waarnemen.

Dergelijke „mutatie's" werden bij rhamnose, glycerol, e.a. ook gevonden door Reiner Mueller (86), Mandelbaum (82), Gildemeister (40), Ledingham (70), Saisawa (112).

Massini (83), Neisser (87), Toenniessen (136), Winslow (145), Christiansen (20), Burk (17) en anderen vatten het verschijnsel als een echte mutatie op; deze B. coli zou juist in dit stadium verkeeren en zij zouden dus voor hunne oogen een nieuw soort zien ontstaan. Steward (127) [1926] heeft aan de hand van de wetten van Mendel trachten aan te toonen, dat men hier met een variatie op de wijze van Mendel te maken heeft: coli kan geregeld uit mutabile verkregen worden, en onder speciale omstandigheden zoowel mutabile als coli uit paracoli.... „the three subgroups are Mendelian variants of one species, mutabile being the central heterozygoot, paracolon the pure dominant and colon the pure recessive."

Hierbij moet hij dan echter een geslachtelijke voortplanting der colibacteriën aannemen.

Anderen verwerpen de mutatie-theorie heelemaal, Kan Ichiro Morishima (85) spreekt van atypische variëteiten of varianten. Als aanpassingsverschijnsel vat Hans Pringsheim (103) het op. Burri (18) [1910], die een dergelijk verschijnsel waarnam tov. saccharose (Bact. imperfectum) neemt een latent gistingsvermogen aan, dat bij kweeken op de desbetreffende voedingsbodem weer actief kan worden, dus een aanpassingsverschijnsel, wat erfelijk blijkt. Dit is nu evenwel juist iets, wat we bij hoogere planten en dieren nooit ontmoeten.

Van Loghem (74—78) vestigt er de aandacht op, dat het begrip erfelijkheid bij bacteriën een andere beteekenis heeft. Men kan hier niet van verschillende individuen spreken; elke bacterie is

eigenlijk een stuk van een ander, die wij de „moedercel" noemen. De reeks bacteriën, die uit een cel ontstaan, de kloon, vertegenwoordigen allen één individu. Dit behoudt zijn eigenschappen, die wij erfelijk plegen te noemen.

Bezien we de variatie's uit dit gezichtspunt, dan zijn al deze verschijnselen veel eenvoudiger te verklaren. Door het kweeken op een lactose bevattende voedingsbodem zullen coli-achtigen, die deze suiker eerst niet aantastten, zich aanpassen en dus lactose pos. worden. Ent men over, dan brengt men een stuk van dit nu lact. pos. individu over op een nieuwe voedingsbodem, waar, door herhaalde deelingen dit stukje uitgroeit tot een verzameling van cellen, waarvan elke cel ook lact. pos. zal zijn. We hebben hier een voorbeeld van een adaptatieve variatie. Hiernaast onderscheidt van Loghem regressieve variatie, d.i. de individueele reactie van de kloon op verstoring der normale functie's.

Als men de variatie's beschouwt in verband met de leefwijze der bacteriën ziet men bij de typhusbacteriën, echte parasieten, een uiterste invariabiliteit; bij B. coli, saprophyten of commensalen, een zeer groote variabiliteit. Hiertusschen in staan de paratyphus-achtigen: een jonge paratyphus B stam is invariabel, oudere zijn dit wel; zij worden op den duur een populatie, waarvan de samenstellende elementen als klonen zijn af te zonderen.

Ter Poorten (100) heeft bij B. coli aangetoond, dat de agglutinabiliteit van verre afstammelingen geleidelijk afneemt. De bij voortkweeken in weefselvocht verkregen stammen van B. coli van verschillende herkomst bleken serologisch veel scherper begrensd dan vroeger en zelfs onderling verwant te zijn geworden.

Van Loghem concludeert hieruit, „dat de colibacterie bij zijn overgang van commensalen tot parasitairen toestand zich functioneel vervormt en dat als uitdrukking van die vervorming zijn lactaseproductie tijdelijk vermindert".

Krijgt nu een dergelijke bacterie zijn lactase-produceerend vermogen weer terug, dan zal dit meest geschieden in een 3—4 daagsche kolonie en wel zeer plaatselijk, dus als knopvorming, op Endo zijn waar te nemen.

Pathogene B. coli groeit ook meest bleek op Endoplaten; we

kunnen dit dus opvatten als normale B. coli, die eenigen tijd in weefselvocht heeft gegroeid en van een commensaal een parasiet is geworden. Daardoor is hij minder variabel en heeft weer tijd noodig om zich aan te passen aan de lactose, daar het vermogen om deze suiker te vergisten tevens was afgenomen.

In verontreinigd water ziet men het zelfde verschijnsel. Als men het aan een natuurlijke reiniging bloot stelt, isoleert men na verloop van tijd ook bleek groeiende, lactose-niet-vergistende coli bacteriën, die meest gemakkelijk aan de lactose weer te wennen zijn. Ook het vermogen om glucose bij 45° C. te vergisten, de proef van Eijkman, vermindert. De secundaire proef van Eijkman bewijst, hoe gemakkelijk ook dit vermogen geregenereerd wordt.

Als men deze variabiliteit der bacteriën eens wat nader beschouwt en ziet, dat vrijwel al onze differentiatie-methodes de eene maal pos. een ander maal neg. kunnen uitvallen, vraagt men zich met Bahr (6) [1928] af, of we heden weer tot de theorie van Nägeli terug zijn gegaan. Hij betwijfelt of we wel met absolute reinculturen werken. Zelf werkte Bahr met ratin (Salmonella) reinculturen. Na $1^1/_2$ maand bewaren in de ijskast, bleek hierin B. coli voor te komen, deze leefde „latent" temidden van al deze Gaertner-achtigen. Zoo zouden zich ook in reinculturen van Aertrijck (Breslau) bacteriën latente Gaertner-stammen kunnen bevinden, in Salmonella's B. coli, welke de z.g. mutatie's veroorzaken.

Zeer toevallig zou het dan wel zijn, dat we bij het herhaalde overenten steeds een weinig van deze „latente" stam mee zouden overbrengen. Op blz. 63 kom ik hier nader op terug.

§ 4 — **Adaptatievormen.**

We hebben gezien, dat vele bacteriën, gekweekt in lactose-, saccharose- of salicine-houdend medium, welke binnen 2 (4) dagen uit deze stoffen geen zuur of gas vormden, de substraten bij langdurig bewaren tenslotte wel ontleedden. Ent men nu weer over in nieuwe cultuurvloeistof, dan zal deze in het algemeen nu wel snel vergist worden. Onze stam heeft dit geleerd, heeft zich leeren aanpassen.

Het leek nu gewenscht, vooral voor de aan lactose-gewende

stammen eens na te gaan, in hoeverre deze eigenschap constant was en of andere eigenschappen misschien ook veranderd waren. Indien dit laatste het geval zou zijn, zou de opvatting van Bahr een groote steun hebben verkregen.

De adaptatiestammen zullen aangeduid worden, door hun oorspronkelijk stamnummer, gevolgd door een letter, welke aangeeft voor welk substraat de vorm aangepast is, en wel l voor lactose, s voor saccharose en sl voor salicine.

a) *Lactose.*

De bacteriën, die gekweekt in lactose-pepton, na 2—3 dagen het medium nog veranderden, werden herhaaldelijk overgeënt en, indien deze suiker dan glad vergist werd, uitgestreken op suikervrije schuine agar. Indien men nu na eenigen tijd weer ent in lactose-pepton-water, zal óf de suiker direct vergist worden, óf dit vermogen blijkt verloren te zijn gegaan. Zou dit ook het geval zijn, indien de stam gedurende eenigen tijd op een lactose bevattend medium bewaard werd?

Acht lab. stammen, vermeld als paracoli, kon ik in zuur- en gasproduceerende variëteiten overvoeren. Hiermee ging parallel een snellere roodkleuring der Endoplaat, niet evenwel een snellere melkcoagulatie: deze was voor 3 stammen resp. 5,14 en 14 dagen gebleven. Andere eigenschappen, zooals gedrag tot de proef van Eijkman ,saccharose en salicine waren evenmin veranderd, waarmee de onwaarschijnlijkheid van Bahr's opvatting is aangetoond.

Na 14 dagen bleek bij 3 stammen een terugslag te hebben plaats gevonden, ook bij het bewaren op Endoagar geschiedde dit. Bovenstaande vraag moet dus ontkennend worden beantwoord.

Eigen stammen: Bij een beschouwing der groepen III en IV ziet men, dat in beiden bacteriën voorkomen, die uit lactose wel zuur vormen, doch geen gas. Deze kleuren tevens lakmoeswei rood. Van gr. III zijn dit de stammen 456, 452, 262 en 263, allen uit water geïsoleerd. Uit deze 4 heb ik de l-vorm verkregen, welke constant bleef.

De stammen 366, 370 en 435 daarentegen waren wel zoo te wennen, dat ze zuur vormden, (370 een spoortje gas), maar verloren deze eigenschap weer snel.

In groep IV zien we een dergelijk verschijnsel. De stammen 346, 345 en 98, die alleen zuur vormen uit lactose en lakmoeswei zijn in gasvormende l-vormen over te voeren. Alleen st. 98 l behoudt deze eigenschap, de overigen slaan spoedig weer terug. Eveneens de stammen 364 en 369, die bij langdurig cultiveeren ook wat zuur vormen.

Resumeerende zien we, dat alleen de stammen 262, 263, 456 en 452 (uit grachtwater) en st. 98 (menschelijke faeces) in constante l-vormen zijn over te voeren. Daar deze stammen sneller blijken af te sterven, dan normale coli-bacteriën (zie hoofdstuk VI) is het dus zeer ongewenscht voor het drinkwateronderzoek om dergelijke stammen eerst door voorbroeding in lactose bouillon in de l-vormen over te voeren. Men zou immers bij het vinden van zoo'n stam besluiten tot de aanwezigheid van normale B. coli. Dit is een groot bezwaar van de methode, zooals die beschreven is in de Amerikaansche watercodex. Tijdens de „presumptive test" kunnen uit atypische soorten adaptatievormen ontstaan, die zich bij de „partially confirmed test" niet van B. coli laten onderscheiden.

b) *Saccharose.*

De techniek is dezelfde als voor lactose.

Vijf lab. stammen, welke oorspronkelijk sacch. — waren, werden in zuurvormende (in één geval zuur en gasvormend) varieteiten overgevoerd; andere eigenschappen bleken niet veranderd.

Eigen stammen: Een overgang tot de gasvorming heb ik hierbij eerst niet kunnen constateeren. Zuur werd tenslotte gevormd bij st. 341, 371 en 343 van groep I en
347, 370 en 435 van de overige groepen.

Na eenige overentingen in sacch. media werden de 6 stammen overgeënt op gewone agar en op agar, waaraan wat sacch. was toegevoegd. De op gewone agar bewaarde stammen sloegen spoedig terug. Contrôle-bepalingen na ca. 14 dagen wezen uit, dat het bewaren op sacch. bevattende agar de stammen iets minder snel deed terugslaan.

c) *Salicine.*

De salicine vergistende variëteiten van eenige lab. stammen,

door wennen verkregen, gedroegen zich tegenover lactose als de oorspronkelijke.

Het verdere gedrag der sl. vormen t.o.v. Eijkman's proef, saccharose en melk was eveneens gelijk gebleven, behoudens eenige ondergeschikte verschillen in den tijd, waarin de vergisting duidelijk waarneembaar wordt.

Eigen stammen: Slechts 4 stammen vormden op den duur wat zuur. St. 347 bracht het niet verder, st. 342, 346 en 456 vormden later ook gas. Bij bewaren, zoowel op gewone, als op salicine-agar bleek st. 364 het vermogen weer verloren te hebben.

Vele z.g. paracolistammen blijken dus gemakkelijk in de lactose-vergistende vormen over te voeren, waarbij men opmerkt, dat over het algemeen slechts die stammen deze eigenschap behouden, welke aanvankelijk uit dit substraat wel zuur, maar geen gas vormden.

Hier zien we dus de winst van een eigenschap, welke echter spoedig weer verloren kan gaan bij het bewaren gedurende eenigen tijd. Het leek mij daarom interessant om na te gaan, of ook gewone colibacteriën mogelijk hun lactose-vergistend vermogen geheel of gedeeltelijk zouden inboeten door een langdurig verblijf in steriel water.

§ 5 — Over de verandering der eigenschappen bij het langdurig bewaren in steriel leidingwater.

Geconcentreerde bacteriënsuspensie's kunnen in tegenstelling met verdunde, zeer lang in leven blijven. Op 6 Nov. 1928 werden troebele suspensie's in gewoon steriel leidingwater gemaakt en bij kamertemperatuur in reageerbuisjes in het donker bewaard.

4 Maart 1929 werd uit iedere buis een oogje geënt in glucosebouillon, lactose-bouillon en Eijkmansche vloeistof. Het resultaat volgt hier:

groep	stam	g.b.	l.b.	Eij.
I	348	++	++	++
	93	++	++	++
	392	++	++	++

groep	stam	g.b.	l.b.	Eij.
II	258	—	—	—
	342	++	++	—
	363	++	++	—
	394	++	++	—
	347	++	++	—
III	366, 367	++	+	—
	452	++	+	—
	456	++	+	—
	262	++	+	—
	263	++	+	—
	435	++	+	—
IV	369	++	+	++
	364, 368	++	+	++
	345, 346	++	+	++
	97, 98	++	+	++

— geen groei + troebeling ++ gasvorming

Het blijkt dus, dat al deze uiteenloopende stammen hunne eigenschappen onveranderd bewaard hebben. Stam 258 uit grachtwater is gestorven.

Ik verwachtte echter een verminderde fermentatieve activiteit van de betreffende bacteriën, wat dus neer zou komen op een achteruitgang van de Eijkman- en de lactosetiter. Van enkele stammen werd daarom nagegaan, hoe het met de onderlinge titers zou staan. Ik verkreeg het volgende beeld:

verd.	stam 348			stam 93			stam 392			stam 346	
	gluc	lact	Eijkm	gluc	lact	Eijkm	gluc	lact	Eijkm	gluc	Eijkm
2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
3	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4	++	++	—	++	++	++	++	++	++	++	++
5	++	++	—	++	++	—	++	++	—	++	—
6	++	++	—	++	++	—	++	++	—	++	—
7	++	++	—	++	—	—	++	++	—	++	—
8	—	—	—	—	—	—	++	—	—	++	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

We zien dus een duidelijk verschil optreden tusschen het vermogen om glucose bij 37° en 45° te vergisten. Verdunning 8 van st. 392, op Endoagar gebracht, gaf kolonie's, welke, overgeënt in gluc.-, lactosebouillon en Eijkmansche vloeistof, de suikers snel vergistten onder gasvorming.

Eenige andere buizen werden ook op Endoagar uitgestreken en gaven kolonie's, welke volkomen gelijk waren aan de oorspronkelijke, ook de knopvorming van st. 348 verliep op de zelfde wijze.

Volgens de tabel blijken voor st. 93 de titers resp. te zijn: 7,6 en 4. Om na te gaan in hoeverre een regeneratie weer zou kunnen optreden, werd een kolonie van de Endoplaat, verkregen door uitzaaiing van buis 7 (gluc. bouillon), in water gesuspendeerd en op gelijke wijze de titers bepaald: van een uiteenwijking der titergrenzen was nu niets meer te bespeuren, verdunning 6 was voor alle 3 nog positief, verdunning 7 neg.

Ook heb ik ter vergelijking een weinig van de herhaaldelijk overgeënte oorspronkelijke stam zoo nagegaan en hier was eveneens verd. 6 ++ en verd. 7 neg.

We kunnen dus de volgende conclusie trekken: Door het bewaren in steriel water, als geconcentreerde suspensie, zal de Eijkmantiter sterk achteruit gaan, de lactosetiter evenwel nagenoeg gelijk blijven aan de glucosetiter. Het verschil tusschen de Eijkmantiter en de beide anderen is door overenten spoedig op te heffen.

We zien hier dus, evenals bij de voortgezette zelfreiniging, dat de titers zeer uit elkaar gaan loopen. Het op den voorgrond treden van resistentere soorten is met deze reinculturen buitengesloten. Ook de gemakkelijke regeneratie bewijst, dat we hier met een zuiver variatieverschijnsel te doen hebben.

14 October 1929 dus een jaar later werden de stammen nogmaals onderzocht: Voor st. 348 was de lactose-activiteit sterk verminderd en deze suiker werd pas na 3 dagen onder gasvorming vergist. De Eijkmantiter was 5 verdunningen minder dan de glucosetiter, voor st. 93 was dit verschil 6 geworden. De glucose en lactosetiters scheelden weinig, ook voor st. 392.

Daar de buisjes slechts met een wattenprop waren afgesloten, en het water dus grootendeels verdampt was, voegde ik wat steriel leidingwater toe. Een titerbepaling eenige dagen nadien gaf het verrassende resultaat, dat de Eijkmantiter weer gelijk was geworden aan de glucosetiter. Door de watertoevoeging is blijkbaar weer eenige groei en dus regeneratie mogelijk geweest.

Einde Januari 1930 heb ik nagegaan, of ook andere eigenschappen veranderd waren, nl.: vergisting van gluc., lact., sacch. en salicine, indolvorming, coagulatie van melk, het gedrag tov. Eijkmansche vloeistof en Endoagar en de V. P. reactie. Behalve een verzwakking van de indolvorming, (st. 394 was indol neg. geworden, zelfs na 6 dagen cultiveeren bij 37°, st. 93 en 392 waren na 6 dagen pas pos.) was geen der eigenschappen veranderd.

De variabiliteitsverschijnselen wijzen dus reeds op de mogelijkheid, dat uit normale colibacteriën atypische stammen kunnen ontstaan, waarmede dan de uiteenwijking der titergrenzen te verklaren zou zijn. De stammen zullen dus eenigszins veranderd moeten zijn, en wel in de richting van een degeneratie. In het volgende hoofdstuk, dat de afsterving in steriel water behandelt, heb ik nagegaan, of deze atypische soorten ook werkelijk minder levenskrachtig zijn, of zij dus sneller afsterven dan normale colibacteriën.

HOOFDSTUK VI.

Het afsterven van Atypische Colibacterien in steriel water.

§ 1 — **Inleiding.**

Door Jongbloed (61) is het afsterven van normale B. coli in steriel water nagegaan. Dit bleek beheerscht te worden door de chemische samenstelling van het betreffende water, het gehalte aan gassen, organische stoffen en de temperatuur.

Het water werd gesteriliseerd door filtratie, zoodat hij ingrijpende veranderingen (het gasgehalte, de hoeveelheid bi-carbonaat, coaguleerbaar eiwit), die bij sterilisatie door verhitten in de autoclaaf zoo gemakkelijk geschieden, vermeed.

In een synthetisch bereid grachtwater bleek de afsterving even snel te gebeuren als in het gesteriliseerde natuurlijke.

Door deze waarnemingen kan mijn onderzoek zeer vereenvoudigd worden. Het is nu alleen van belang, hoe het met de verhouding van de afstervingssnelheden mijner bacteriën tov. normale B. coli staat. Sterven de atypische soorten sneller of langzamer af?

§ 2 — **Wijze van onderzoek.**

Deze gebeurde in hoofdzaak op de zelfde wijze, als door Jongbloed is aangegeven. Grachtwater werd door filtratie door een kaars van Chamberland gesteriliseerd, in kolven van 1 liter gebracht en gecontrôleerd. Hierin werd dan de zorgvuldig verdeelde bacteriënsuspensie gebracht en zooveel mogelijk dagelijks de titer bepaald. Naast een eenvoudige telling heb ik in vele gevallen een titerbepaling gedaan in glucose- en lactose-pepton (37°) en Eijkman's vloeistof (45°).

De waarde van deze titerbepalingen wordt evenwel grooter, naarmate men van elke buis meer duplicaten maakt. Om redenen

van technische aard was dit meestal niet mogelijk, zoodat in de meeste gevallen maar één verdunning werd gemaakt.

De telplaten werden van gewone bouillonagar gegoten, zooveel mogelijk in duplo. Hier heeft men bovendien nog altijd een contrôle door de andere verdunningen. Alle kiemtellingen hebben betrekking op het aantal bacteriën per cc. in de oorspronkelijke kolf.

Het gebruikte water was afkomstig uit de Nieuwe Prinsengracht te Amsterdam; het zoutgehalte bleek vrij hoog te zijn. De analyse moge hier volgen:

			ionen balans: anionen	kationen
p_H	8.0			
Cl'	3581.46	mgr/L.	101.00	
SO_4''	493.8	„	10.28	
HCO_3'	242.8	„	3.99	
vrij CO_2	16.8	„		
$Na^{\cdot}$	2044.0	„		88.87
CaO	237.0	„		8.46
$Mg^{\cdot\cdot}$	212.4	„		17.48
$Fe^{\cdot\cdot\cdot}$	0.14	„		0.01
NH_4	2.78	„		0.17
SiO_2	0.6	„		
			115.27	114.99

Nitraten en nitriten waren afwezig.

Een troebele suspensie van B coli bevat na jaren nog levende kiemen, terwijl een geringe beginconcentratie aanleiding geeft tot spoedige afsterving. Hoewel het „aantal" bacteriën, dat men in het water brengt, dus wel van belang is, maakt het weinig verschil, of men de aanvangsconcentratie op waarden tusschen $\frac{1}{2}$—2 millioen houdt. Het aantal werd dan ook steeds zooveel mogelijk op deze waarde gehouden. Berekening van het aantal in te brengen kiemen, door suspendeeren in water, zooals Jongbloed het deed, geeft moeilijkheden bij eenige soorten, daar de afsterving te snel gaat. De tijdens de proeven gevonden getallen

werden allen op 1.000.000 omgerekend en in de grafieken met de nat. logarithme aangegeven.

Van elke groep werden 2 verschillende bacteriën genomen en van elk 2 maal de afsterving bepaald.

§ 3 — **Bacterien der Ie groep.**

Ter vergelijking werd allereerst een typische B. coli genomen, nl. stam 95, uit menschelijke faeces geïsoleerd.

Twee proeven werden eenigen tijd na elkaar aangezet. De eerste (p) bleek geënt met 1.800.000 kiemen; na 10 dagen kon ik in één cc. geen colikiemen meer aantoonen. De tweede proef (t) was na 9 dagen weer steriel.

Het gebruikte water schijnt de afsterving nogal te bevorderen. De waarden, die JONGBLOED eerst vindt, zijn tenminste veel grooter voor B. coli, nl. 20—60 dagen (blz. 43), later vindt ook hij tijden, wisselend tusschen 10 en 16 dagen (blz. 70, 73, 76).

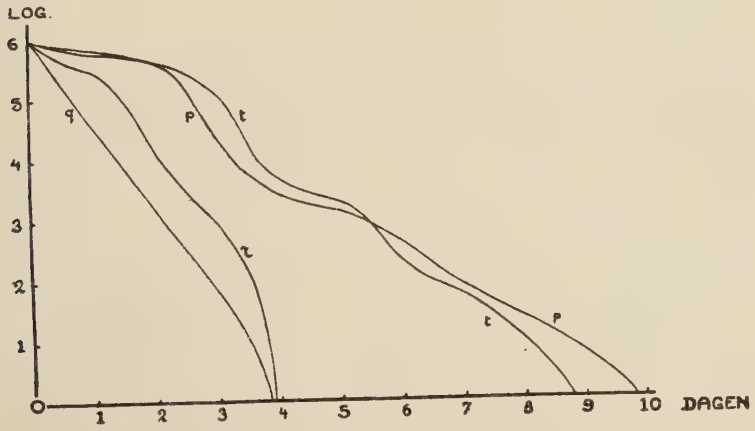


FIG. I. Vermindering van het aantal levende bacteriën in steriel gracht-water bij groep I.
p, t: stam 95, normale B. coli. q, r: stam 348, B. coli „mutabile."

Een beeld van de vermindering geven de tabellen, waarvan de eerste kolom het aantal getelde bacteriën voorstelt, de tweede dit aantal omgerekend op een aanvangsconc. van 1.000.000 en de derde de log. hiervan. Deze laatste waarde is in grafiek I voorgesteld. Beide lijnen vertoonen een eigenaardig golvend verloop.

Als atypische vertegenwoordiger is st. 348 genomen. Deze vertoont een verminderde lactose activiteit teg. Endo. Binnen 4 dagen waren in beide gevallen alle ingebrachte kiemen verdwenen.

Uit dit eerste voorbeeld blijkt dus al een mindere resistentie tegen het bewaren in water bij deze atypische variëteit (q en r).

dagen	p			t		
0	1.800.000	1.000.000	6.00	1.060.000	1.000.000	6.00
1	1.100.000	612.000	5.79	630.000	594.000	5.77
2	700.000	389.000	5.59	420.000	396.000	5.60
3	45.000	25.000	4.40	126.000	119.000	5.08
4	4.800	2.670	3.43	5.100	4.810	3.68
5	2.600	1.440	3.16	2.100	1.980	3.30
6	790	439	2.64	220	208	2.32
7	150	83	1.92	60	57	1.76
8	41	23	1.36	10	9	0.97
9	10	6	0.78	0	0	— ~
10	0	0	— ~			

dagen	q			r		
0	660.000	1.000.000	6.00	390.000	1.000.000	6.00
1	26.000	39.400	4.60	125.000	320.000	5.51
2	970	1.470	3.17	5.500	14.100	4.15
3	46	70	1.85	360	924	2.97
4	0	0	– ~	0	0	– ~

Latere bepalingen met geringere aanvangsconcentratie's voor st. 95 gaven het zelfde beeld.

§ 4 — **Bacterien der IIe groep.**

Deze treden later op den voorgrond bij de zelfreiniging en men zou dus een grootere resistentie dan van de normale darmcolibacterie kunnen verwachten. Het tegendeel blijkt waar. St. 258 werd in 4 gevallen onderzocht en steeds waren na 2—3 dagen

alle kiemen verdwenen. Twee dezer proeven, één met zeer geringe begin conc. vindt men vermeld onder m en ij.

Een overeenkomstige stam (363) uit uitwerpselen van slakken geïsoleerd, gedroeg zich op dezelfde wijze. Binnen 3 dagen was ook deze stam volledig afgestorven (d en s).

258	m			ij		
0	32.000	1.000.000	6.00	880.000	1.000.000	6.00
1	1.300	41.000	4.61	4.300	4.880	3.69
2	0	0	– ~	8	9	0.95
3				0	0	– ~

363	d			s		
0	1.340.000	1.000.000	6.00	2.000.000	1.000.000	6.00
1	23.000	17.000	4.23	350.000	175.000	5.24
2	18	13	1.11	3.700	1.850	3.27
3	0	0	– ~	0	0	– ~

In figuur II ziet men deze waarden grafisch voorgesteld.

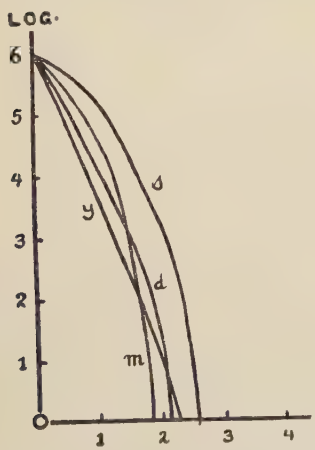


FIG. II. Vermindering van het aantal levende bacteriën in steriel grachtwater bij groep II.
m, ij: stam 258 } atypische B.coli.
d. s: stam 363 }

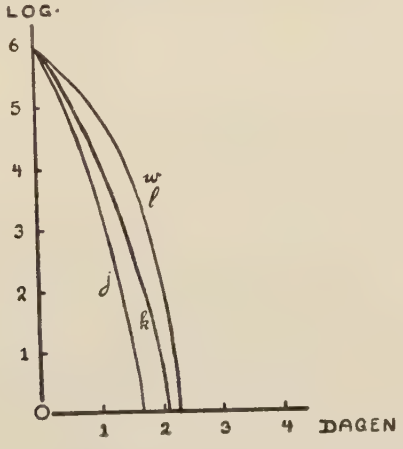


FIG. III. Vermindering van het aantal levende bacteriën in steriel grachtwater bij groep III.
j, w: stam 263.
k, l.: stam 456.

§ 5 — **Bacterien der IIIe groep.**

Twee organismen, uit water geïsoleerd, gaven beiden het zelfde verschijnsel te zien, als bij de vorige groep. Ook hierbij waren de bacteriën, tegen de oorspronkelijke verwachting in, zeer snel verdwenen; na 3 dagen waren er geen levende kiemen meer aan te toonen.

St. 263 uit vijverwater en st. 456 uit grachtwater geïsoleerd, treft men aan, resp. onder j, w en k, l vermeld.

263	j			w		
0	1.300.000	1.000.000	6.00	670.000	1.000.000	6.00
1	2.400	1.850	3.27	67.000	100.000	5.00
2	0	0	– ~	116	173	2.24
3				0	0	– ~

456	k			l		
0	480.000	1.000.000	6.00	200.000	1.000.000	6.00
1	6.200	13.000	4.11	16.000	80.000	4.90
2	3	6	0.80	30	150	2.20
3	0	0	– ~	0	0	– ~

Figuur III geeft een beeld van de afsterving; de overeenkomst met fig II is treffend.

§ 6 — **Bacterien der IVe groep.**

Hoewel deze organismen door mij in water niet gevonden konden worden, in faeces daarentegen voorkomen, heb ik ook van 2 vertegenwoordigers dezer groep de afsterving op gelijke wijze nagegaan. Hoewel zij alleen van de vorige groep verschillen, door het bezit van het vermogen om glucose bij 45° te kunnen vergisten, blijkt de resistentie weer grooter te zijn en ongeveer overeen te komen met die van de atypische stam der Ie groep (348). De menschelijke stam 98 (n en v) vertoont een regelmatige vermindering, de dierlijke stam 345 (g en x) golvende lijnen en deze nadert hierin de normale B. coli.

98	n			v		
0	650.000	1.000.000	6.00	590.000	1.000.000	6.00
1	600.000	920.000	5.96	250.000	424.000	5.63
2	72.000	111.000	5.04	47.000	79.600	4.90
3	1.000	1.540	3.19	3.800	6.440	3.81
4	0	0	$-\sim$	73	124	2.09
5				0	0	$-\sim$

345	g			x		
0	490.000	1.000.000	6.00	400.000	1.000.000	6.00
1	276.000	560.000	5.75	108.000	290.000	5.43
2	54.000	110.000	5.04	18.000	45.000	4.65
3	11.500	23.500	4.37	200	500	2.70
4	290	590	2.77	7	17	1.24
5	10	20	1.30	1	3	0.40
6	0	0	$-\sim$	0	0	$-\sim$

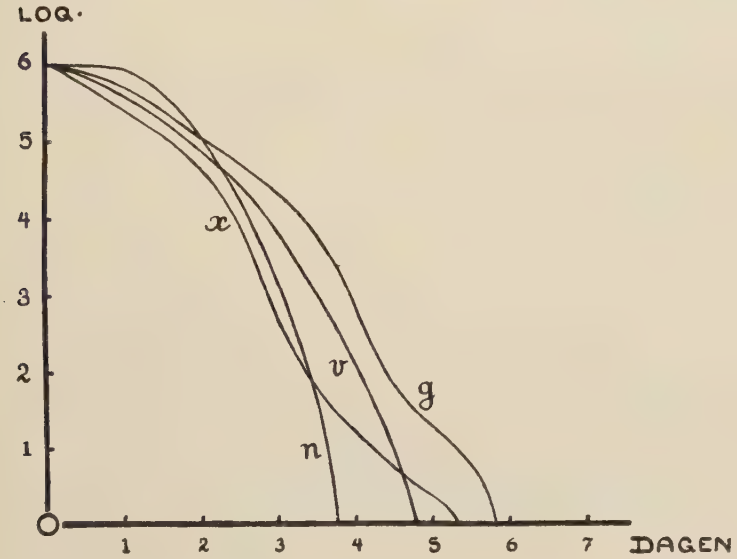


FIG. IV. Vermindering van het aantal levende bacteriën in steriel grachtwater bij gr. IV. n, v: stam 98. g, x: stam 345.

In figuur IV heb ik deze waarden grafisch voorgesteld.

§ 7 — **Titers in glucose- en lactose-bouillon en Eijkman's vloeistof.**

Deze scheelden over het algemeen weinig. Meestal bleef de Eijkmantiter iets achter, 1 à 2 verdunningen, terwijl de glucose en lactose titer gelijk waren.

Van de IIe groep konden de glucose en lactose titers vergeleken worden. Deze waren steeds nagenoeg gelijk, soms lactose één achter, ook wel één voor.

§ 8 — **Overzicht.**

We zien, dat er slechts een klein verschil bestaat tusschen de resistentie van leden der IIe en IIIe groep. Beiden verdwijnen practisch even vlug; deze 2 groepen zijn dan ook voor een gemiddelde te samen genomen. In onderstaande tabel en in grafiek V

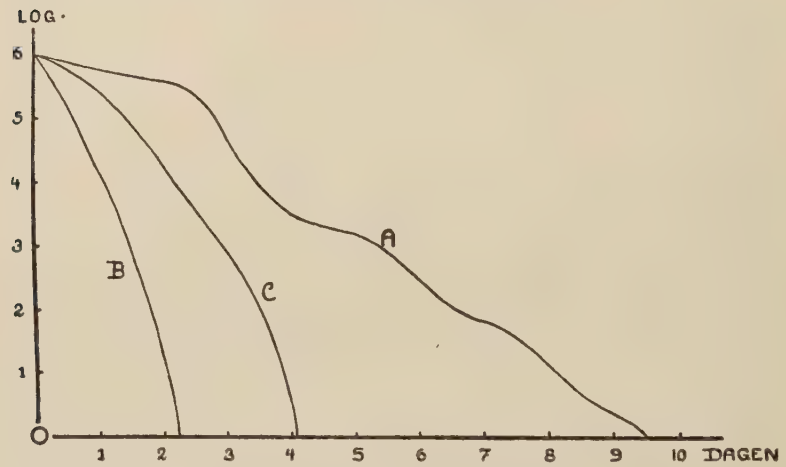


Fig. V. Vermindering van het aantal levende bacteriën in steriel grachtwater
A: voor normale B. coli (st. 95).
B: voor atypische B. coli (stammen van gr. II en III).
C. voor atypische B. coli (mutabile) (stam 348 en 98).

ziet men de waarden voor de normale B. coli, voor de stammen van groep II en III en voor de zoo nauw verwante stammen 348 en 98:

gemiddelden:	norm. B. coli	st. 348 en 98	gr. II en III
dagen: 0	6.00	6.00	6.00
1	5.78	5.42	4.26
2	5.60	4.31	1.32
3	4.74	2.95	– ~
4	3.50	0.52	
5	3.23	– ~	
6	2.48		
7	1.84		
8	1.16		
9	0.39		
10	– ~		

Normale B. coli is dus resistenter dan de atypische soorten;

Evenwel heb ik en vele anderen met mij, uit ruw water, dat eenigen tijd voor herverontreiniging beschut is geweest, bacteriën van de groepen II en III kunnen aantoonen. Dat ze hierin oorspronkelijk reeds voorhanden waren als Salmonella-achtige organismen, welke volgens van Loghem bovendien een beperkte variabiliteit moet bezitten, is dus onwaarschijnlijk.

Beschouwing van het hoofdstuk over variabiliteit leert ons, dat de stammen uit water afgezonderd, in tegenstelling met die uit dierlijke faeces, in hooge mate variabel zijn. Aan de beide voorwaarden:

grootere resistentie dan B. coli en

weinig variabel,

is niet te voldoen, zoodat de tweede mogelijkheid veel aan waarschijnlijkheid wint, n.l.: *dat deze bacteriën op te vatten zijn als varianten van normale B. coli* en zich op dezelfde wijze gedragen als colibacteriën, die onder invloed van weefselvocht pathogene eigenschappen hebben verkregen (Ter Poorten, v. Loghem) of door antiseptica adaptatie vormen hebben opgeleverd. (Penfold, Revis, Smirnow). (vgl. Henningsson) (54).

In hoeverre we in deze 3 gevallen een gemeenschappelijk agens aan te nemen hebben, is op het eerste gezicht niet te zeggen. Bij voortkweeken in weefselvocht kan men zich ook een tegenwerkende kracht voorstellen tegen de bacteriëngroei, een

reactie van het lichaam, zich uitend in het afscheiden van stoffen, die deze groei zooveel mogelijk zullen tegenwerken. Dit is volkomen identiek met directe toevoeging van antiseptica. Beiden manifesteeren zich in een verminderde activiteit t.o.v. lactose, waarmede gepaard gaat een toeneming der pathogeniteit. Deze bacteriën zouden dus voor den mensch gevaarlijk kunnen worden.

Ook bij de zelfreiniging heeft iets dergelijks plaats. Welke de invloed is, die de geconstateerde verandering in de eigenschappen der bacteriën teweeg brengt, is niet duidelijk. Voor de vermindering van hun aantal worden meestal de protozoën verantwoordelijk gesteld. Verandering van eigenschappen is daardoor echter niet te verwachten. Vermindering van levenskracht bij langdurig verblijf in een ongunstige omgeving (lage temperatuur, geringe voeding), mag als waarschijnlijke oorzaak worden aangenomen, hoewel ze niet voldoende is, om de snelle verandering in eigenschappen te verklaren, die men aan de, uit zich reinigend water te verkrijgen, colisoorten waarneemt.

Daarom was het belangrijk om het gedrag van mengsels van typische en atypische soorten te vergelijken.

§ 9 — **Afsterving van mengsels van bacterien.**

De voorafgaande bepalingen zijn steeds geschied met bacteriën, afkomstig van één reincultuur. In de natuur zullen we steeds naast elkaar zeer vele soorten aantreffen en het leek mij mogelijk, dat de afsterving dan een ander beeld zou vertoonen. Nadat dus de afsterving van atypische stammen genoegzaam bekend was, heb ik mengsels van twee stammen onderzocht en wel de normale coli stam 95 naast de atypische stam 456.

Deze proeven zijn in tegenstelling met de vorige, in den winter gedaan en door de lagere temperatuur gingen alle processen veel langzamer.

In 2 kolven, elk ong. $^1/_2$ L. steriel grachtwater bevattend, werden suspensie's van het betreffende bacteriën materiaal gebracht; eerst heb ik van elk afzonderlijk telplaten gemaakt en titers bepaald, direct daarna vermengd en nogmaals zoo onderzocht.

Daar st. 456 saccharose vergist, werd ook deze suiker mede in het onderzoek betrokken. Door de telplaten i.p.v. met gewone

bouillonagar met Endoagar te gieten, hoopte ik uit het aantal rood- en wit groeiende kolonie's de hoeveelheden levende bacteriën van elke stam te kunnen vervolgen.

Proef w: Op 4 Nov. werd de proef op bovenvermelde wijze ingezet. De kolf, waarin st. 95 gesuspendeerd was, bevatte 1.770.000 kiemen per cc. (op bouillon agar geteld); de 2e kolf met st. 456: 960.000 kiemen. Na vermenging werden ter controle nogmaals bouillon agar platen gemaakt: per cc. bevatte het mengsel: 1.380.000 kiemen. Daar de verdeeling in 2 halve liters maar op het oog was gedaan, komt deze controle proef dus zeer goed uit (theor.: 1.365.000 kiemen).

Na 24 uur werden weer titerbepalingen gedaan en telplaten gemaakt ditmaal met Endoagar als voedingsmedium. Na 48 uur broeden waren hierop duidelijk de roode en witte kolonie's te onderscheiden. Plaat 4 (dus 10^{-4} cc.) bevatte 81 roode en 44 witte kolonie's als gemiddelden van 2 duplo's, plaat 5 : 7 roode en 5 witte.

Op 6 Nov. werd de beoordeeling lastiger, omdat de verschillen kleiner werden. Met moeite lieten zich op plaat 4 naast 86 roode 9 witte kol. s onderscheiden, terwijl plaat 5 geen enkele witte vertoonde op de 11 roode.

Op 7 Nov. dus 3 dagen na het enten, heb ik tevens telplaten van bouillonagar gemaakt en deze bleken veel meer kolonie's te bevatten, dan de Endo-telplaten. Bouillonplaat 4 bevatte 122 kol.s, Endo plaat 4 vertoonde 62 donkerroode kol.s met een rood hof, tegenover 17 rose puntjes, totaal 79 kol.s. Slechts 65 % der kolonie's op bouillon agar vertoonden groei op Endo agar. Voor de volgende dagen bleef dit percentage ongeveer gelijk, succ.: 70, 69 en 66 om 11 Nov. af te nemen tot 44 %, 14 Nov. tot 22 %, 16 Nov. tot 11 %, en de 23e tot slechts 5 %.

Uit latere proeven is mij gebleken, dat direct na het suspendeeren de 2 titers vrijwel gelijk zijn. Door het laten staan in steriel grachtwater zal dus het aantal bacteriën, geteld op Endoagar tegenover bouillonagar steeds geringer worden.

Tot 11 Nov. is het mij gelukt om op de Endoplaten naast roode, nog witte kol.s op te merken. Na dien dag werd sacch. ook niet meer vergist.

Om na te gaan, of de witte kolonie's werkelijk afkomstig waren

van bacteriën van st. 456 en niet van veranderde cellen van st. 95, werd vanaf 6 Nov. steeds één witte kolonie nader onderzocht: lactose-lakmoes-pepton was na 1 dag rood, maar geen gas; gluc. ++, sacch. ++, salicine —, Endoagar eerst wit, dan gedeeltelijk rood, om ten slotte weer wit te worden. Zonder twijfel hebben we hier dus nog steeds st. 456 voor ons.

Op 14 Nov. zien we, dat het genoemde percentage 22 was geworden. Van bouillonagarplaat 3 (230 kol.s) werden 32 kolonie's afgeënt op een Endoplaat. In al deze gevallen was na 24 uur een duidelijke groei en roodkleuring waar te nemen, hoewel de Endoagarplaat 3 slechts 51 kol.s vertoonde. Hieruit blijkt dus wel duidelijk, dat we een „tijdelijke verliesfunctie" voor ons hebben, welke zeer gemakkelijk te regenereeren is; precies hetzelfde verschijnsel, als we in onze titerbuisjes zien: de Eijkmantiter is vrij geregeld één achter bij de glucosetiter. Maakt men evenwel uit de glucose buis een plaatcultuur, dan zal iedere kolonie in staat zijn om Eijkmansche gisting te geven.

Daar het ons opgevallen was, dat kolonie's aan het oppervlak een duidelijker groei vertoonden, dan in de agar, heb ik op 16 Nov. tevens strijkculturen op de beide agars gemaakt. Ook hier was de verhouding het zelfde, n.l. 2 op Endo- tegenover 23 kolonie's op bouillonagar.

Men mag dus zonder fout de gewone telmethode (in de agar) toepassen.

Tegen het einde der proef (19 Nov.) was ook het beeld op de Endoplaten totaal veranderd. Alleen de kolonie's waren nog duidelijk rood. Eenige verkleuring van den omtrek was niet merkbaar. Hier ziet men dus een verminderde activiteit tov. lactose te voorschijn komen, zich ook uitend in het resultaat van de titerbepalingen: die tov. lactose was 2 verdunningen achter bij die tov. glucose.

25 Nov. waren nog slechts 9 kolonie's per cc. op bouillon agar platen te vinden.

Als begin concentratie voor de grafiek (VI) heb ik aangenomen het aantal kolonie's op bouillon agar op 7 Nov. n.l. 1.220.000 en alle waarden hierop berekend. De eerste tabel geeft het resul-

taat van de kiemtellingen op bouillon- en Endo-agar, (roode en witte samen) de tweede het aantal bacteriën van de 2 stammen afzonderlijk geteld op Endoagar. (blz. 82).

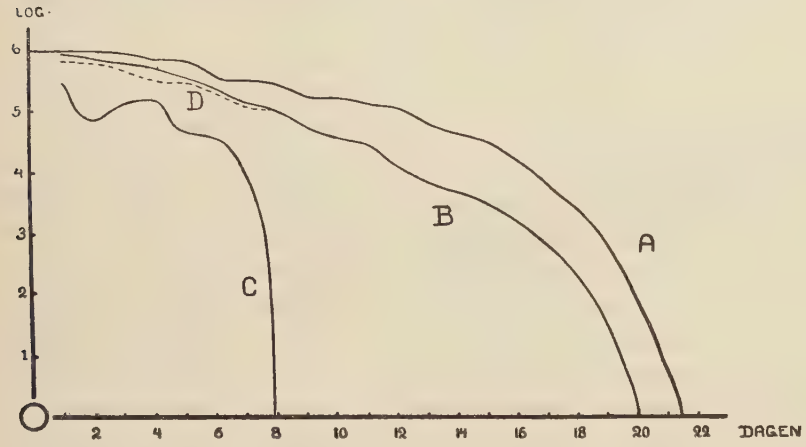


FIG. VI. Vermindering van het aantal levende kiemen in steriel gracht-water bij een mengsel van normale (st. 95) en atypische (st. 456) B. coli. A: geteld op bouillon agar. B: totaal aantal kolonie's op Endo-agar. C. wit groeiend op Endoagar. D: rood groeiend op Endoagar.

St. 95 is blijkbaar binnen 22 dagen afgestorven, st. 456 binnen 8 dagen. De laatste stam geeft een sterk golvende lijn te zien. De eerste dag is de afsterving enorm groot, de 2 volgende dagen krijgen we een vermeerdering, waarna na een aanvankelijk langzame, plots wederom een zeer snelle afsterving volgt.

Met deze proef is duidelijk aangetoond, dat de activiteit tov. Endoagar (lactose) van normale B. coli tijdens het afstervingsproces vermindert; niet alleen worden de verschillen tusschen bouillonagaren Endoagar titer steeds grooter, maar ook het beeld van de kolonie's op Endoagar verandert, de metaalglans verdwijnt en de roodkleuring bepaalt zich uitsluitend tot de kolonie zelf. De uiteenwijking van de glucose- en de lactose-titer volgens de onderzoekingen van Clemesha is hierdoor dus wel te verklaren.

De verzwakte, gedegenereerde, kolonie's waren steeds direct weer te regenereeren; de mogelijkheid, dat dit proces langer zou duren en we dus bacteriën der IIe of IIIe groep zouden kunnen verkrijgen, is echter geenszins uitgesloten.

I

Nov.	bouillon agar			Endo agar			
dag	aant.bact.	omgerekend	log.	aant.bact.	omgerekend	log.	%
4	1.365.000	1.100.000	6.05				
5				1.250.000	1.025.000	6.01	
6				950.000	780.000	5.89	
7	1.220.000	1.000.000	6.00	790.000	650.000	5.81	65
8	920.000	750.000	5.88	640.000	520.000	5.72	70
9	700.000	570.000	5.85	480.000	390.000	5.59	69
10	490.000	400.000	5.60	330.000	270.000	5.43	67
11	430.000	350.000	5.55	190.000	160.000	5.19	44
13	380.000	310.000	5.49	150.000	120.000	5.09	40
13	240.000	200.000	5.29	76.000	62.000	4.79	32
14	230.000	190.000	5.28	51.000	42.000	4.62	22
15	190.000	160.000	5.19	42.000	34.000	4.54	22
16	160.000	130.000	5.12	17.000	14.000	4.14	11
18	60.000	49.000	4.69	6.600	5.400	3.73	11
19	42.000	34.000	4.54	4.200	3.400	3.54	10
21	9.000	7.400	3.87	900	740	2.87	10
23	700	570	2.85	35	29	1.46	5
25	9	7	0.85	0	0	—~	
26	0	0	—~				

II

	roode kolonie's op Endo.			witte kolonie's op Endo.		
Nov.	aant.bact.	omgerekend	log.	aant.bact.	omgerekend	log.
5	810.000	664.000	5.82	440.000	360.000	5.56
6	860.000	705.000	5.85	90.000	74.000	4.87
7	620.000	510.000	5.71	170.000	140.000	5.15
8	440.000	360.000	5.56	200.000	164.000	5.21
9	410.000	336.000	5.53	70.000	57.000	4.67
10	280.000	230.000	5.36	50.000	41.000	4.61
11	170.000	140.000	5.15	20.000	16.000	4.20
12	150.000	120.000	5.09	0	0	—~

In tabel I is tevens aangegeven het percentage, vermeld op blz. 79.

Het verloop der titers was het volgende:

Nov.	glucose						lactose						Eijkman					
	2	3	4	5	6	7	2	3	4	5	6	7	2	3	4	5	6	7
4					++—						++—						++—	
5					++—						++—						++—	
6					++—						++—						++—	
7					++—						++—						++—	
8					++—						++—					++ —		
9				++ —							++—					++ —		
10				++ —						++ —						++ —		
11				++ —						++ —						++ —		
12				++ —						++ —						++ —		
13				++ —						++ —					++ —			
14				++ —					++ —						++ —			
15				++ —					++ —						++ —			
16				++ —					++ —						++ —			
18				++ —					++ —					++ —				
19				++ —				++ —							++ —			
21				++ —				++ —					—					
23		++ —					++ —						—					
25	—						—											

De eerste 3 dagen zijn de titers gelijk, dan verandert het eerst de Eijkman-titer, gevolgd door de beide anderen. Na 9 dagen zien we het zelfde, alleen de glucosetiter blijft één verdunning grooter. Op het laatst nemen de Eijkman- en lactose-titers sterk af. Na 14 Nov. is de activiteit tov. lactose dus zoodanig verminderd, dat dit bij de titerbepalingen ook reeds merkbaar wordt.

§ 10 — **Verschil der Bouillonagar- en Endoagar titer.**

Daar de vorige proef met een mengsel van twee soorten bacteriën gedaan is, sprak het van zelf, dat de verschijnselen ook voor elke stam afzonderlijk dienden te worden nagegaan.

Hierbij kon ook gelegenheid gevonden worden, om telplaten te maken en deze bij 45° te plaatsen. Voor deze Eijkman-titer is ook een verminderde activiteit te verwachten.

Eenige voorproefjes mogen kort vermeld worden:

Proef z: St. 95 werd geënt in steriel grachtwater en na 1 dag het aantal kiemen bepaald met telplaten; resultaat:

bouillon agar plaat 4: 123 kiemen. } 50 %
Endo „ „ 4: 61 „ }

na 10 dagen:

bouillon „ „ 3: 182 „ } 25 %
Endo „ „ 3: 47 „ }

Een gewone titerbepaling met gasbuisjes gaf voor:
verdunning 4: alle drie ++.
„ 5: gluc. en lact. ++, Eijkm. —.
„ 6: alle drie —.

Proef b: Een 1 dag oude cultuur van st. 95 werd gesuspendeerd en direct daarna telplaten gemaakt op bouillon- en Endo-agar. Op beiden vertoonden zich 900.000 kiemen per cc. (nl. bouillon ag. pl. 4: 92, en Endo-ag.pl. 3: 940 kol.s.)

Na 3 dagen getallen resp.: 390.000 en 46.000. (12 %).
Na 7 „ „ „ : 1.060 en 110. (10 %).

Tevens werd hier een bouillonagarplaat bij 45° aangezet; aantal kol.s. was: 6 (dus 0,6 %).

Proef c': Ook de atypische stam (456) werd zoo nagegaan: direct gesuspendeerd en kiemgetal bepaald met telplaten:

plaat 4 bouillon-agar bevatte: 188 kiemen.
„ 4 Endo „ „ : 186 „

Na 3 dagen waren deze getallen per 1 cc.: 114 en 50. (44 %).

Uit deze proeven blijkt dus:

Direct na het suspendeeren zijn bouillonagar en Endoagar titer gelijk.

Voor een normale en voor een atypische colistam gaan deze beide titers meer en meer uiteenloopen, naarmate het afstervingsproces voortschrijdt.

Ter nadere bevestiging heb ik nog een uitgebreide proef op de volgende wijze gedaan: Twee kolven werden op 11 Dec. gevuld met ca. 1 L. steriel water, in kolf a st. 95, in kolf c st. 456 gesuspendeerd. Van elk werd nu ca. $^1/_3$ deel in een derde kolf e gebracht. Hier krijgen we dus 3 proeven (a, c en e) naast elkaar, waarbij alle omstandigheden gelijk zijn en die we dus met elkaar kunnen vergelijken.

Bepalingen direct na de verdeeling bewezen weer, dat de kiemgetallen eerst nagenoeg gelijk zijn.

Proef a: Deze bevat dus één stam, nl. de normale B.coli. De bouillonagar titer vermindert elke dag normaal, na 16 dagen bleken er nog 380 kiemen per cc. over te zijn. De Endo-titer was de eerste dagen merkwaardigerwijs vrijwel gelijk aan de bouillonagar titer, pas na 5 dagen werd het percentage 59, om daarna snel af te nemen. De Eijkman-titer was steeds veel lager en het percentage was tegenover bouillonagar in de meeste gevallen beneden 10.

De groei bij 45° is slecht. Plaatst men een dergelijke plaat naderhand bij 37°, dan mogen er soms een paar kolonie's bij komen, het slotaantal is toch steeds veel geringer (10 %) dan directe cultuur bij 37°.

Omstreeks 23 Dec., dus na 12 dagen, was het beeld op de Endo platen dikwijls sterk veranderd. Na 24 uur broeden waren de kolonie's nog wit tot zwak rose; de roode kleur kwam pas later.

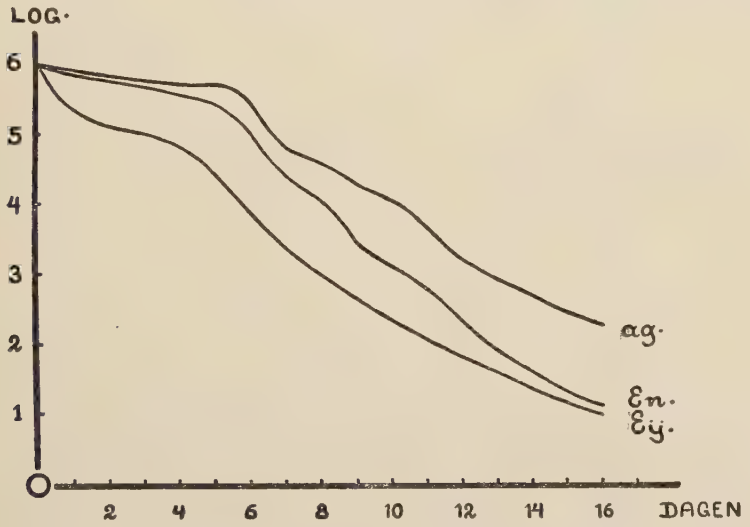


FIG. VII. Vermindering van het aantal levende kiemen in steriel grachtwater voor B, coli commune (st. 95).
ag: geteld op bouillonagar bij 37°.
Eij: geteld op bouillonagar bij 45°.
En: geteld op Endoagar bij 37°.

24 Dec. bevatte de Endoplaat met 1 cc.: 152 kol.s. Waren de meesten normaal rood, enkelen zelfs met metaalglans, velen ver-

toonden om de roode kern een witte rand; 6 kol.s. waren duidelijk wit, 22 meer wit dan rood. Eenige dier atypische kolonie's werden overgeënt in lactosebouillon, steeds werd dit krachtig vergist.

Hieruit volgt dus wel zeer overtuigend, dat tijdens het afstervingsproces normale colibacteriën tegenover de Endo-voedingsbodem een verminderde activiteit gaan vertoonen, welke echter gemakkelijk te regenereeren is.

De kiemgetallen op bouillonagar 37°, id 45° (Eijkm.) en Endoagar werden weer omgerekend en de log. hiervan grafisch uitgezet (fig. VII).

Proef c: St. 456 (lact. +, Eijkm. —.)

De Endo-titer was hierbij de eerste dag hooger dan de bouillonagar titer, na 5 dagen de helft. Zeer sterk nam de Eijkman-titer af: na 1 dag bedroeg het aantal bacteriën 1/10.000 van dat op bouillon agar bij 37°.

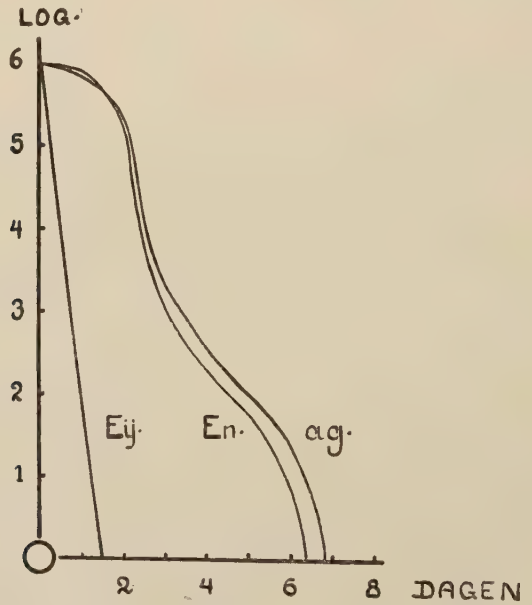


Fig. VIII. Vermindering van het aantal levende kiemen in steriel grachtwater voor atypische B. coli. (st. 456).
ag: bouillonagar 37°.
Eij: bouillonagar 45°.
En: ændoagar 37°.

Na 3 dagen was geen groei meer te constateeren op plaat 0 bij 45°, na 7 dagen evenmin bij 37°. (fig. VIII).

Proef e: Deze is op te vatten als de resultante der proeven a en c. Bij het begin waren de titers weer nagenoeg gelijk. Verhouding rood: wit was 9 : 14. (1 : 1,56).

Den volgenden dag waren deze getallen: 7 : 8 (1 : 1,14).

Verhouding bouillonagar/Endoagar = 67 %, dus normaal.

„ „ /Eijkman = 24 %.

De beoordeeling van het resultaat op Endoagar werd na 2 dagen moeilijker: tusschen de 43 roode en 47 witte kol.s. op pl. 4 waren 5 dubieus. Verhouding rood tot wit wordt grooter (1 : 1,09) om dan veel sneller toe te nemen (10 : 1, 20 : 1).

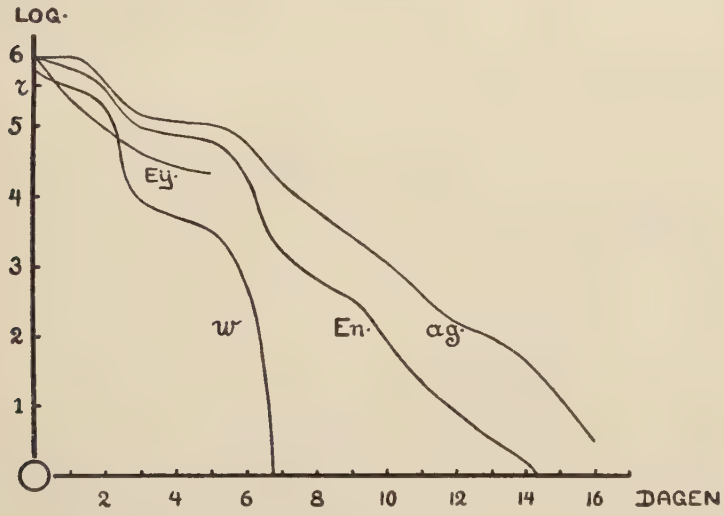


FIG. IX. Vermindering van het aantal levende kiemen in steriel grachtwater voor een mengsel van typische en atypische B. coli, resp. st. 95 en st. 456.
ag.: aantal bacteriën op bouillonagar.
Eij: id. bij 45°.
En: totaal aantal kiemen op Endoagar.
w: aantal wit groeiende kiemen hierop.
r: aantal rood groeiende kiemen hierop.

Na 18 Dec. (7 dagen), waren er geen witte kol.s. meer aanwezig, hetgeen dus overeenstemt met de waarnemingen bij proef c.

Omstreeks 21 Dec. veranderde het beeld op de Endoplaten ook hier, de kol.s waren veelal wit omrand; entte men zoo zorgvuldig mogelijk van dit witte deel iets over in lactose bouillon, dan volgde ook hier weer steeds krachtige gisting.

De Eijkmanproeven heb ik niet volledig kunnen vervolgen, evenmin bij proef a, wegens een defect aan de stoof van 45°.

Figuur IX geeft een beeld van de vermindering der kiemgetallen op bouillonagar bij 37° (agar), bij 45° (Eijkm.) en op Endoagar, waarvoor is aangegeven het totale aantal kolonie's (Endo), en het aantal wit groeiende (wit). De lijn, die het aantal roodgroeiende kolonie's zou aangeven is ter wille van de duidelijkheid niet geteekend. Deze zou beginnen bij r en na 3 dagen practisch reeds samenvallen met de lijn voor het totaal aantal.

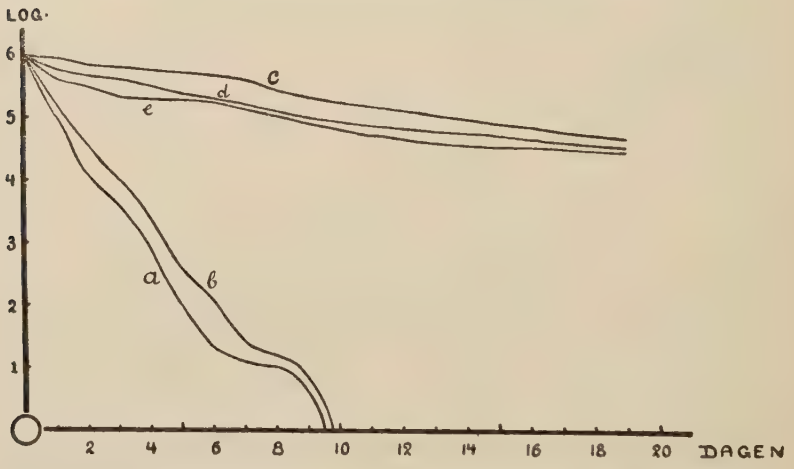


FIG. X. Vermindering van het aantal levende bacteriën in steriel leidingwater.
a: voor st. 456, Endoagar 37°.
b: voor st. 456, bouillonagar 37°.
c: voor st. 95, bouillonagar 37°.
d: voor st. 95, Endoagar 37°.
e: voor st. 95, bouillonagar 45°.

Proef e is in goede overeenstemming met proef w (zie blz. 77).

Vergelijken we de grafieken voor a, c en e, dan zien we na 3—5 dagen bij alle drie de zelfde merkwaardige vertraging.

§ 11 — **Proeven met steriel leidingwater.**

Daar de bacteriën over het algemeen in dit grachtwater zoo snel afsterven en dit mogelijk op het proces invloed zou kunnen hebben, heb ik voor de stammen 95 en 456 ook het verloop der afsterving in steriel leidingwater (duinwater) nagegaan.

Het aantal bacteriën werd geteld op bouillonagar bij 37° en bij 45° (Eijkm.) en op Endoagar. Groei bij 45° trad bij st. 456 niet op.

In fig. X ziet men de uitkomsten grafisch voorgesteld. Binnen 10 dagen is st. 456 afgestorven, het verschil tusschen de twee titers is gering; ook voor st. 95 zijn deze verschillen veel kleiner dan bij het grachtwater. Het verloop der afsterving van beide stammen tov. elkaar is evenwel volkomen het zelfde bij deze twee soorten water.

SLOTBESCHOUWING.

Mijn onderzoek kon in de eerste plaats het reeds vroeger geconstateerde feit bevestigen, dat verontreinigd water, aan spontane zelfreiniging overgelaten, door de geijkte coliproeven des te meer afwijkende typen van B. coli oplevert naarmate de zelfreiniging intensiever is geweest. De eerste phase van dit proces uit zich in een terugloopen van de zg. Eijkman-titer, en het wordt dan mogelijk, uit dit water stammen te kweeken, die de proef van Eijkman niet meer vertoonen, doch overigens nog in alles op het normale B. coli gelijken (groep II). Het grootste gedeelte dezer bacteriën krijgt echter het verloren vermogen weer zeer spoedig terug. Gaat het reinigingsproces iets verder, dan zijn ook stammen te isoleeren, die nog slechts de glucose bij 37° vergisten, maar niet de lactose, doch morphologisch en cultureel nog tot de groote coligroep behooren (groep III). Deze atypische colisoorten zijn onderwerp van veel studie geweest en ze blijken biochemisch verwant met vertegenwoordigers van het geslacht Salmonella, waarvan ze overigens door gebrek aan pathogeniteit te onderscheiden zijn (paracoli). Echte pathogenen worden in dit reinigingsstadium niet meer aangetroffen, terwijl typische colibacteriën zeer schaarsch zijn. Het watermonster zou dus uit hygiënisch oogpunt ongevaarlijk geworden zijn, zoodat we tot het eenigszins paradoxale besluit komen, dat, hoe meer de geïsoleerde stammen in biochemisch opzicht tot de pathogenen naderen, des te minder verdacht het water wordt, waaruit ze te isoleeren zijn. Ten slotte werd nog een vierde atypische groep gevonden, waarbij de proef van Eijkman positief was, doch lactose niet werd vergist.

Een quantitatief onderzoek naar de stofwisselingsproducten dezer stammen uit glucose bewees, dat deze methode ter differentiatie totaal ongeschikt is: vertegenwoordigers uit één groep vertoonen dikwijls een geheel ander beeld en een verband tus-

schen de stofwisseling en de mate van atypie is dus niet aan te geven. De hoeveelheid uit lactose gevormd barnsteenzuur blijkt evenwel vrijwel daaraan evenredig te zijn. Deze hoeveelheid kan ca. 50 % van de vergiste lactose bedragen.

De genoemde vermindering der activiteit tegenover lactose is volkomen vergelijkbaar met wat we waarnemen, als we B. coli in weefselvocht kweeken of aan chemische agentia blootstellen. Uit de verzwakte bacterien kunnen dan door een of andere oorzaak atypische vormen ontstaan, die door een beter aanpassingsvermogen aan de slechte condities zich eenigen tijd kunnen handhaven.

De afsterving der verschillende stammen in steriel water werd nagegaan en leverde het bewijs, dat de atypische colibacteriën sneller te gronde gaan dan normale B. coli. Het is dus onmogelijk, dat deze eerste bacteriën oorspronkelijk al aanwezig waren als Salmonella-achtige organismen, die bij het voortschrijden der zelfreiniging meer en meer naar voren zouden komen. Ook de grootere variabiliteit der organismen uit water, vergeleken bij die uit de faeces van koudbloedigen plaatst hen dichter bij B. coli dan bij de pathogenen, die aan veel geringere variaties blootstaan. Deze atypische colibacteriën moeten dus opgevat worden als verlies- of defectieve vormen van Bact. coli, vallende binnen deze soort, zoodat de afzonderlijke soortnamen, die door Clemesha, Mc. Conkey en vele anderen aan de stammen worden toegekend, te verwerpen zijn.

Het beeld, dat wij ons van den invloed der zelfreiniging op de vertegenwoordigers der coligroep in het betreffende water maken kunnen, is nu als volgt:

Dadelijk na de verontreiniging met vuil van de aardoppervlakte (steeds van faecalen aard) is het water beladen met darmbacteriën, waaronder het typische B. coli overheerscht. Dan beginnen de zelfreinigingsprocessen, in hoofdzaak bestaande uit een natuurlijke afsterving, sterk beheerscht door de chemische samenstelling van het water, en de werking van protozoën. Daardoor worden de gelederen snel gedund en tevens boeten de overblijvenden het vermogen in om bij 45° de glucose te vergisten (welke eigenschap in verreweg de meeste gevallen gemakkelijk te regenereeren is). Langer verblijf berooft hen ook gaandeweg van

het vermogen der vergisting van de lactose. Dit laatste is vaak moeilijk, vaak in 't geheel niet terug te winnen, zoodat het bacteriologische wateronderzoek slechts bacteriën oplevert, die in hun eigenschappen op Salmonella gaan lijken, doch inderdaad verlies-vormen van B. coli zijn.

Ten opzichte van de beoordeeling van water op grond van het colionderzoek valt hieruit het volgende te leeren:

Is het water in een toestand, dat colistammen, die de proef van Eijkman geven, het bacteriologisch beeld volkomen beheerschen, dan mag men aannemen, dat kort geleden besmetting met vuil der aardoppervlakte heeft plaats gehad, zoodat het water verdacht moet worden genoemd. De constateering van dezen toestand levert in 't algemeen geen moeilijkheden op. Deze komen eerst, indien de zelfreiniging in den watervang, waaruit geput wordt, reeds is ingetreden. De zoo belangrijke verdwijning van de bij 45° gistende colibacteriën wordt veel buiten beschouwing gelaten en men stelt zich tevreden met het aantoonen van lactose-vergistende vertegenwoordigers der coligroep, om op grond daarvan een oordeel te vellen. Men begaat daarbij vaak de groote fout, dat men met de groote veranderlijkheid der coligroep geen rekening houdt, doch met alle middelen tracht de door verblijf in het water verzwakte colibacteriën nieuw leven in te blazen en hun de verloren eigenschap der lactosegisting te hergeven.... om ze dan als hygiënisch gevaarlijk te brandmerken! De voedingsvloeistoffen, die deze regeneratie het snelst bewerken, worden dan als de voor het colionderzoek meest geschikte gekenmerkt. Deze werkwijze moet, mede op grond van mijn onderzoek, ten stelligste veroordeeld worden. Wil men een juist inzicht krijgen in de bacteriologische gesteldheid van het water, dan is het noodig zich een beeld te vormen van de bacterie- en voornamelijk van de coli-flora, in den toestand, waarin deze zich bevindt op het moment van onderzoek. Het is dus niet geoorloofd, verzwakte vormen van B. coli door voorcultuur in lactosevloeistoffen eerst „op te kweeken", doch men zal de mate van verzwakking (verlies van Eijkman'sche functie of het vermogen om lactose te vergisten) hebben vast te stellen en op grond daarvan hun beteekenis als indicatoren eener gevaarlijke faecale verontreiniging moeten opmaken.

Deze beteekenis wordt geheel beheerscht door het inzicht, dat een hygiënisch gevaarlijke besmetting van het water door spontane afsterving der betreffende bacteriën, zoowel als door de werking der protozoën, sneller wordt opgeruimd dan de haar steeds in grooten getale begeleidende normale colisoorten. Zijn de laatste verdwenen of bevinden ze zich in een verzwakten (atypischen) vorm in het water, dan mag men de afwezigheid van pathogene soorten zonder bedenken aannemen, zoodat het watermonster als ongevaarlijk mag worden aangemerkt [1]).

Als middel nu, om den toestand der aanwezige colibacteriën te kunnen beoordeelen, zonder ze uit het water af te zonderen, is de proef van Eijkman van bijzondere beteekenis, omdat ze slechts positief is voor „gezonde" colibacteriën en iedere verzwakking van deze zich allereerst uit in een verzwakking van het vermogen om bij 45° te gisten, zonder nog het vergistend vermogen tegenover lactose aan te tasten. Afscheiding der colibacteriën en beproeving der reinculturen bij 45° (de zg. secundaire Eijkman'sche proef) is ongeoorloofd, omdat ze de mogelijkheid der regeneratie miskent. Is dus het aantal colibacteriën, dat gisting bij 45° vermag te veroorzaken, belangrijk teruggeloopen ten opzichte van diegene, die deze functie niet meer bezitten doch nog wel de lactose bij 37° vergisten kunnen, dan zal zich dit uiten in eenuiteenloopen der gistingsgrenzen en zal men dit feit mogen aanmerken als een saneering van het betreffende water. Het is dan vrijwel onverschillig, welke eigenschappen de achtergebleven soorten overigens nog hebben, met name is een differentiatie, zooals de watercodex der American Public Health Association die beschrijft van veel minder waarde dan het feit van het uiteenloopen der grenzen zelf.

Door Clemesha is nog het uiteenwijken dezer grenzen voor lactose- en glucosebouillon uitvoerig nagegaan (de proef van Eijkman heeft hij niet gebruikt). Het blijkt echter wel uit mijn proeven, evenals uit die van Holwerda in Indië, dat dit in Europa slechts zeer langzaam, in Indië slechts onder directen invloed van het zonlicht gebeurt, zoodat ik meen aan die feiten minder practisch gewicht te mogen hechten.

[1]) De hygiënische vraag, of de betreffende waterbron steeds dit ongevaarlijke water zal blijven geven, blijft hier buiten beschouwing.

Het lijkt mij echter van veel belang, dat men aan de quantitatieve uitvoering van de proef van Eijkman naast de lactosevergisting een grooter gewicht gaat hechten dan tot nu toe, om zoodoende te geraken tot een juistere bepaling van de beteekenis der colibacteriën in water en daarmee tot een beter bacteriologisch wateronderzoek.

LITTERATUUR.

1 Abraham. *Untersuchungen über eine durch ein atypischen Colibacterium hervorgerufene Milchinfection.* C.f.B. I **113**, 74. (1929).

2 Adam, A., *Ueber die Biologie des Dyspepsiecoli und ihre Beziehungen zur Pathogenese der Dyspepsie und Intoxikation.* Jahrb. f. Kinderh. (1923), 101.

3 Arkwright. *Natural variation of B. acidi lactici with respect to the production of gas from carbohydrates.* J. of Hyg. **13**, 68. (1913).

4 Ayers & Rupp. *Simultaneous acid and alkaline bacterial fermentation from dextrose and the salts of the organic acids, respectively.* J. of Inf. Dis. **23**, 188. (1918).

5 Bahr, L. *Untersuchungen über die Aetiologie der Cholera Infantum.* C. f. B. I **66**, 335. (1912).

6 —— *Beitrag zur Diskussion der Artsumwandlung der Paratyphus Enteritis Bacterien.* Deutsch. Tierärtzl. Wochenschr. **47**, 786. (1928).

7 —— *How are the Gaertner Bacteria distinguished from other bacteria nearly related to them?* J. of Stat Med. **37** nr. 8. (1929).

8 Bardsley, D. A. *B. coli as index of faecal pollution of watersupplies. J. of Hyg.* **25**, 11. (1926).

9 Bedford, R. H. *A rapid method for obtaining the Voges-Proskauer reaction.* J. of B. **18**, 93. (1929).

10 Bergey, D. H. *Manuel of determinative bacteriology.* Baltimor, 1925.

11 Blachstein. *Contribution à la biologie du bacille typhique.* Arch. d. Sc. biol. V. I. (zie Radzievsky).

12 Blumenberg. *Ueber den Indoltiter nach Gersbach zur Begutachtung von Wasserproben.* C. f. B. I **107**, 386. (1928).

13 Bock, F. *Untersuchungen über Bakterien aus der Paratyphusgruppe.* Arb. Kais. Ges. A. **24**, 238. (1906).

14 Bondo, E. Compt.rend. (1921), 84.

15 Braak, H. R. *Onderzoekingen over vergisting van glycerine.* Diss. Delft. (1928).

16 Bull & Pritchett. *The agglutinability of blood and agar strains of typhoid bacilli.* J. of Exp. Med. **24**, 35. (1916).

17 Burk, A. *Mutation bei einem der Koligruppe verwandten Bakterium.* A. f. Hyg. **65**, 235. (1908).

18 Burri, R. *Ueber scheinbar plötzliche Neuerwerbung eines bestimm-*

ten Gärungsvermögens durch Bacterien der Coligruppe. C. f. B. II **28**, 321. (1910).

19 Castellani & Chalmers. *Manual of tropical medicine.* London, (1919).

20 Christiansen, M. *Ueber das Vorkommen von nicht-gasproduzierenden Paracolibacillen in Fällen von Paracolibacillose beim Kalbe.* C. f. B. I **74**, 474. (1914).

21 Clemesha, W. W. *Bacteriology of surface waters in the tropics.* Calcutta and London, (1912).

22 Darling. *The distribution of B. coli in faeces.* Am. J. of Publ. H. **13**, 822. (1923).

23 Duclaux, M. *Sur le dosage des alcohols et des acides volatils.* Ann. Past. **9**, 265. (1895).

24 Ehrenfest, H. *Studien über die „B. coli-ähnlichen" Mikroorganismen normaler menschlicher Fäces.* A. f. Hyg. **26**, 369. (1896).

25 Endo, S. *Ueber ein Verfahren zum Nachweis der Typhusbacillen.* C. f. B. I **35**, 109. (1904).

26 Eyken. *Lactosegisting als hulpmiddel bij het onderzoek van watermonsters.* Gen. Tijdschr. N.O.I. **56**, 951. (1916).

27 Fabry, P. *Note sur le bacille coli modifié, ne produisant plus l'indol.* C. R. (1922), 87.

28 Fèvre, A. J. le. *Bijdrage tot de kennis der bacterieele gistingen.* diss. Utrecht, (1924).

29 Flu, P. C. *De gistingsproef van C. Eijkman ter opsporing van faecale verontreiniging van water.* Gen. Tijdschr. N.O.I. **55**, 817. (1915).

30 Fothergill, Ler. D. *Unusual tpyes of non-lactose-fermenting, Gram-negative bacilli from acute diarrhea in infants.* J. of Inf. Dis. **45**, 393. (1929).

31 Frankland & Fox. *On a pure fermentation of mannite and glycerine.* Proc. Roy. Soc. London **46**, 345. (1889).

32 Frankland, Stanley & Frew. *Fermentation induced by the pneumococcus of Friedländer.* J. Chem. Soc. **59**, 253. (1891).

33 Frankland & Lunsden. *The decomposition of mannitol and dextrose by the Bac. ethaceticus.* J. Chem. Soc. **61**, 432. (1892).

34 Frankland & Mac Gregor. *Fermentation of arabinose with the Bac. ethaceticus.* J. Chem. Soc. **61**, 737. (1892).

35 Georgia & Morales. *The diagnostic value of neutral red lactose peptone media for the coli-aerogenes group.* J. of Am. Water W. Ass. **16**, 631. (1926).

36 Germano & Maurea. *Vergleichende Untersuchungen über den Typhusbacillus und ähnliche Bacterien.* Ziegler's Beitr. **12**. (1893) (zie Radzievsky).

37 Gersbach. *Der Nachweis fäcaler Wasserveruntreinigung mittels der Indolprobe.* C. f. B. I **88**, 145. (1923).

38 GILBERT & LION. *Contribution à l'étude des bactéries intestinales.* Sem. Med. **17**, 130. (1893).
39 GILBERT. Sem. Med. (1895). (zie Radzievsky).
40 GILDEMEISTER, E. *Ueber den Einflusz von Rhamnose und Raffinose auf das Wachstum von Bakterien.* Arb. Kais. Ges. A. **45**, 226. (1913).
41 GOSLINGS, J. *Verdere bijdrage tot het Salmonella vraagstuk.* Diss. Amsterdam, (1928).
42 GRAAFF, W. C. DE. *De biochemische eigenschappen der paratyphus-bacillen.* Leiden, (1919).
43 —— *Een en ander over het bacteriologisch wateronderzoek.* Tijdschr. v. Verg. Geneesk. **7**, 108. (1922).
44 GREY. *The enzymes which are concerned in the decomposition of glucose and mannitol by B. coli communis.* I, II, III, V. Proc. Roy. Soc. B. **87**, 472. (1914).
45 Proc.Roy.Soc.B. **90**, 75. (1919).
46 „ **90**, 92. (1919).
47 „ **92**, 135. (1921).
48 GRIMBERT. *Colibacilles produisant de l'acide succinique avec la lactose.* C. R. **3**, 191. (1895).
C.R. **3**, 684. (1896).
49 GROSSE BOHLE. *Beiträge zur Frage der Selbstreinigung der Gewässer.* Diss. Arnsberg. (1900).
50 GRYNS, G. Die *Fähigkeit Glucose bei 46° C. zu vergären, als erworbene Eigenschaft.* C. f. B. I **86**, 173 (1921).
51 GYÖRGY, P. *Beitrag zur Systematik der Paracoli-Bazillen.* C. f. B. I **84**, 321. (1920).
52 HARDEN, A. *The chemical action of B. coli communis and similar organisms on the carbohydrates and allied compounds.* J. Chem. Soc. **79**, 610. (1901).
53 HARRISON & VAN DER LECK. *Aesculine bile salt media for water analysis.* C.f.B. II **22**, 547. (1909).
54 HENNINGSSON. *Eine neue Methode zur Beurteilung der fäkalen Veruntreinigung des Wassers.* Z. f. Hyg. **74**, 253 (1913).
55 HERTER. *Notes on the action of sodium benzoate on the multiplication and gasproduction of various bacteria.* J. Biol. Chem. **7**, 59. (1909).
56 HILL, SEIDMAN, STADNICHENKO & ELLIS. *A study of 200 cultures of Gram negative bacilli, isolated from cases of genito-urinary infection.* J. Bact. **17**, 205. (1929).
57 HISS, P. H. *On fermentative and agglutinative characters of bacilli of the dysentery group.* J. Med. Res. **13**, 1. (1904).
58 HOLST, P. F. *Bakteriologische Untersuchungen über die Massenvergiftung in der Irrenanstalt Gaustad im Jahre 1891.* Baumg. Jahresb. pg. 326. (1894).

59 Holwerda, K. *Enkele proeven ter bestudeering van de verandering der bacterien flora bij bewaren van verontreizigd oppervlaktewater, enz.*, Med. Dienst Volksgez. N.O.I. **17**, II, 411. (1928).
60 Jensen, C. O. *Kälberruhr.* Kolle-Wassermann 2e Aufl. VI, 129, (1913).
61 Jongbloed, J. M. *Het afsterven van Bacterium coli in steriel water.* Diss. Amsterdam. (1928).
62 Kiefer, K. H. *Ein Beitrag zur Lebeusfähigkeit der Bakterien.* C. f. B. I **90**, 1. (1923).
63 Kligler, I. J. *Studies on the classification of the colon group.* J. of Inf. Dis. **15**, 187. (1914).
64 Klotz. *Tempory alteration of character of an organism belonging to the colon group.* J. of Inf. Dis. suppl. 2, 35. (1906).
65 Kneteman, A. *The Duclaux method for the estimation of valatile acids.* Rec. Trav. Chim. (1928). 950.
66 Konrich. *Zur Bewertung des Bact. coli im Wasser.* Klin. Jahrb. **23**, 1. (1910).
67 Koser, S. A. *Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group.* J. of Bact. **8**, 493. (1923).
68 —— *The correlation of the citrate utilization by members of the colon-aerogenes group with other differential characteristics, enz.* J. of Bact. **9**, 59. (1924).
69 Kuwabara. *Ein lactose-spaltender Typhusbacillus.* C. f. B. ref. **42**, 135. (1909).
70 Ledingham, J. C. G. *A reversion phenomenon in bacterial fermentation.* J. of Hyg. **17**, 409. (1918).
71 Lembke, W. *Bact. coli anindolicum und Bact. coli anaerogenes.* Arch. f. Hyg. **27**, 384. (1896).
72 Levine, M. *Bacteria fermenting lactose and their significance in wateranalysis.* Bull. 62. Iowa state college. (1921).
73 Loghem, J. J. van. *Het El-Tor vraagstuk in de bacteriologie.* Ned. T. v. Gen. (1915) II, 2384.
74 —— *Veranderlijkheid van bacteriën, vergeleken binnen de typhus-coli groep.* Id. (1919) II 784.
75 —— *Veranderlijkheid van de colibacil.* Id. (1921) II, 1966.
76 —— *Veranderingen van bacteriën in verband met het individueele in den bacterie-kloon beschouwd.* Id. (1921) II, 2981.
77 —— *Over „nieuwe" eigenschappen van bacteriën.* Id. (1922) I, 1494
78 —— *De individualiteitstheorie der bacterieele veranderlijkheid.* Id. (1929) I 655.
79 Macconkey, A. *Lactose fermenting bacteria in faeces.* J. of Hyg. **5**, 33. (1905).
80 —— *Further observations on the differentiation of lactose-fermenting bacilli, etc.* J. of Hyg. **9**, 86. (1909).
81 Macfadyen, Nencki & Sieben. *Untersuchungen über die chemi-*

sche Vorgänge im menschlichen Dünndarm. Arch. f. Exp. Path. u. Pharm. **28**, 311. (1891).

82 Mandelbaum, M. *Ueber das Bacterium metatyphi.* C. f. B. I **63**, 46. (1912).

83 Massini, R. *Ueber einer in biologischer Beziehung interessanten Kolistamm.* Arch. f. Hyg. **61**, 250. (1907).

84 Miessner & Wetzel. *Infectiöse Aufzuchtkrankheiten der Tiere.* Kolle-Wassermann 3e Aufl. VI 605. (1929).

85 Morishima, Kan-Ichiro. *Variations in typhoid bacilli.* J. of Bact. **6**, 275. (1921).

86 Mueller, Reiner. *Mutationen bei Typhus- und Ruhrbakterien.* C. f. B. I **58**, 97. (1911).

87 Neisser, M. *Ein Fall von Mutation nach de Vries bei Bakterien und andere Demonstrationen.* C. f. B. I, **38**, 98. (1906).

88 —— *Bemerkungen zu der Arbeit von W. Blumenberg.* C. f. B. I **109**, 346. (1928).

89 Niszle. *Bacterium coli als Krankheitserreger.* Kolle-Wassermann 3e Aufl. VI 3, 415. (1929).

90 Oliver & Perkins. *Acid production at partial oxygen tension and under aerobic conditions etc.* Inf. Dis. **22**, 507 (1918).

91 Paine, F. S. *The destruction of acetyl-methyl-carbinol by members of the colon-aerogenes group.* J. of Bact. **13**, 269. (1926).

92 Peckham. J. Exp. Med. **2**, 550. (1897).

93 —— Brit. Med. J. Supp. 2. 363. (1911).

94 Penfold, W. J. *Studies in bacterial variation.* J. of Hyg. **11**, 30. (1911).

95 —— *On the specificity of bacterial mutation.* J. of Hyg. **12**, 195. (1912).

96 Pere. *Contribution à la biologie du B. coli commune et du Bacille typhique.* Ann. Past. (1892).

97 —— *Colibacille de nourrison et colibacille de l'adulte.* C. R. (1895).

98 Perkins, R. G. *Classification of spore-free Gram-neg. aerobic rods.* J. of Inf. Dis. **37**, 232. (1925).

99 Perry & Montfort. *Some atypical colon aerogenes forms, isolated from natural waters.* J. of Bact. **6**, 53. (1921).

100 Poorten, F. H. ter. *Over variabiliteit in de zoogenaamde typhus-coligroep.* Diss. Amsterdam. (1920).

101 Pottevin, H. *Contribution à la bactériologie des gatsro-entérites infectueuses.* Ann. Past. **19**, 426. (1905).

102 Prell, H. *Zur Kenntnis einiger defektiver Coli-Formen.* C. f. B. I **80**, 225. (1917).

103 Pringsheim, H. *Variabilität niederer Organismen.* Berlin, (1910).

105 Radzievsky, A. *Beitrag zur Kenntnis des Bacterium coli.* Zeitschr. f. Hyg. **34**, 369. (1900).

106 Refik, E. *Sur les divers types de colibacille des eaux.* Ann. Past. **10**, 242. (1896).

107 Remmelts, H. *Untersuchungen betreffend B. coli comm. bei Säugetieren, Vögeln und Fischen.* Vlaardingen (1912).

108 Revis. *Note on the artificial production of a permanently atypical B. coli.* C. f. B. II **31**, 1. (1911).

109 Rhein. *Ueber die Bildung von Phenol in menschlichen Darm.* Bioch. Z. (1917), 84.

110 Rivas, D. *An improved and rapid test for indol in the broth cultures etc.* J. of Inf. Dis. **4**, 641 (1907).

111 Sachse, M. *Untersuchungen über die Bedeutung des Coli-nachweises im Wasser und der Eijkmanschen Methode.* Z. f. Hyg. **81**, 15. (1916).

112 Saisawa, K. *Ueber den modifizierenden Einflusz von kohlehydrathaltigen Nährböden auf Bakterien.* Z. f. Hyg. **74**, 61. (1913).

113 Salus & Hirn. *Zur Wasserbegutachtung und zur Coli-Biologie.* C. f. B. I **90**, 286. (1923).

114 Savage. *The bacteriological examination of watersupplies.* London, (1906).

115 Scheffer, M. A. *De suikervergisting door bacteriën der Coli-groep.* Diss. Delft. (1928).

116 Schroeder, H. *Ueber das Vorkommen von Bact. coli commune im Fischdarm.* Diss. Kiel. (1927).

117 Schultz. *Die Beeinflussung der Beweglichkeit von Bakterien der Typhus-Coli-Gruppe in Nährlösungen mit Zuckerzusätzen.* Diss. Straatsburg. (1917).

118 Segre, S. *Vergleichung einiger Methoden zur Nachweis von B. coli in Wasser und zur Bestimmung des Coli-Titers.* C. f. B. II **78**, 105. (1929).

119 Simmons, J. S. *A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon-aerogenes groups etc.* J. of Inf. Dis. **39**, 209. (1926).

120 Small & Julianelle. *Biologic and serologic studies of bac. mucosus group.* J. of Inf. Dis. **32**, 456 (1923).

121 Smirnow, M. R. *Biological variations of bacteria.* J. of Bact. **1**, 385. (1916).

123 Smit, J. *Bacteriologische en chemische onderzoekingen over de melkzuurgisting.* Diss. Amsterdam, (1913).

124 —— *Modern bacteriologisch wateronderzoek.* (Chem. Weekbl. **21**, 461, 566. (1924).

125 —— *Zur Bewertung der Kolibefunde im Trinkwasser.* Vom Wasser, II. 83 (1928).

126 Snapper, I. *De ontleding van bloed en bloedkleurstof door cholera en Tor-vibrionen.* Ned. T. v. Gen. (1918) II 848.

127 Steward. *Mendelian variation in the paracolon-mutabile-colon group.* J. of Hyg. **25**, 237. (1926).

128 Stickdorn. *Untersuchungen über die der Coli-Typhus-Gruppe angehörigen Erreger von Kälberkrankheiten.* C. f. B. I **76**, 245. (1915).

129 Stovall & Starr Nichols. *The M.R. and V.P. reaction with special reference to routine water analysis.* J. of Inf. Dis. **23**, 229. (1918).

130 Stutzer, M. I. *Darmbakterien der Kaltblütter.* C. f. B. II **66**, 345. (1926).

131 Tavel & Lanz. *Ueber die Aetiologie der Peritonitis.* Mitt. Kl. u. Inst. d. Schweiz. Ie reihe, heft 1. (1894).

132 Taylor, Martin, Naidu & Naidu. Ind. J. Med. Res. **14**, 801. (1927).

133 Tenbroeck, C. *A non-gas producing strain of the hog-cholera bacillus, etc.* J. Exp. Med. **24**, 213. (1916).

134 Thompson, J. *The chemical action of Bacillus cloacae (Jordan) on glucose and mannitol.* Proc. Roy. Soc. B. **84**, 500. (1912).

135 Titze & Weichel. *Kälberruhr.* Mitt. Kais. Ges. A. **33**, 516. (1910).

136 Toenniessen, E. *Ueber Vererbung und Variabilität bei Bakterien, etc.* C. f. B. I. **73**, 248; **75**, 97. (1914).

137 Trawinski, A. *Ueber das Vorkommen von Bakterien der Typhus-Coligruppe im Darminhalt gesunder Schweine.* Z. f. Hyg. **83**, 117. (1917).

138 Twort, F. W. *The fermentation of glucosides by bacteria of the typhoid-coli group.* Proc. Roy. Soc. London B. **79**, 329. (1907).

139 Voges & Proskauer. *Beitrag zur Ernährungs Physiologie und zur Differential Diagnose der Bacterien der Hämorrhagischen Septicamie.* Z. f. Hyg. **28**, 20. (1898).

140 Weldin, J. C. Iowa State Coll. J. of Sc. **1**, 121. (1927). (zie Fothergill).

141 Wenner & Rettger. A *systematic study of the Proteus group of bacteria.* J. of Bact. **4**, 331. (1919).

142 Wiemann. *Die Paracolibacillosis (Jensen) der Kälber.* Inaug. diss. Bern-Königsberg. (1909). (zie Miessner & Wetzel).

143 Winslow & Cohen. *The distribution of B. coli and B. aerogenes types in polluted and unpolluted water.* J. of Inf. Dis. **23**, 90. (1918).

144 —— *Relative viability of B. coli and B. aerogenes types in water.* J. of Inf. Dis. **23**, 82. (1918).

145 Winslow, Kligler & Rothberg. *Studies on the classification of the colon-typhoid group of bacteria, etc.* J. of Bact. **4**, 429. (1919).

TABE

groep:	gluc.	Eijkm.	lact.	sacch.	dulc.	adon.	inul.	V.P.	indol	beweg.	gelatine	M.R.	citr. Kos.	citr. Simm.	sal.	
I																
392	+ +	+ +	+ +	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+ +	-
93	+ +	+ +	+ +	—	+	—	—	—	+	—	—	+	—	—	+	-
348	+ +	+ +	+ +	+ +	—	—	—	+	+	—	—	+	—	—	+ +	-
398	+ +	+ +	+ +	+ +	+	—	—	+	+	+	+	+	+	b	+ +	-
397	+ +	+ +	+ +	+ +	+	—	—	+	+	+	—	+	+	—	+	-
433	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+	—	+	+	—	—	+	+	b	+	-
449	+ +	+ +	+ +	+ +	+	—	—	+	+	—	—	—	+	—	+ +	-
260	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+	—	—	+	—	—	+	+	g	+ +	-
71	+ +	+ +	+ +	+ +	+	—	—	—	+	+	—	+	—	—	+ +	—
344	+ +	+ +	+ +	+ +	+	—	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—
389	+ +	+ +	+ +	+ +	+	—	—	—	+	+	—	+	—	—	+ +	—
261	+ +	+ +	+ +	+ +	—	—	—	—	—	—	—	+	+	b	+ +	-
69	+ +	+ +	+ +	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—
95	+ +	+ +	+ +	—	+	—	—	—	+	+	—	+	—	—	+ +	-
341	+ +	+ +	+ +	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	+ +	—
96	+ +	+ +	+ +	—	+	—	—	—	+	+	—	+	—	—	+ +	-
365	+ +	+ +	+ +	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
371	+ +	+ +	+ +	—	+	—	—	—	+	—	—	+	—	—	+ +	—
257	+ +	+ +	+ +	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
259	+ +	+ +	+ +	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+ +	+
343	+ +	+ +	+ +	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	g	—	—
II																
363	+ +	—	+ +	+ +	—	—	—	—	+	+	—	+	—	—	+ +	+
342	+ +	—	+ +	+ +	—	—	—	—	—	+	—	+	+	b	—	—
258	+ +	—	+ +	+ +	+	—	—	—	—	+	—	+	+	—	+ +	+
394	+ +	—	+ +	+ +	+	+	+	—	+	+	+	+	+	b	+ +	+
347	+ +	—	+ +	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—
84	+ +	—	+ +	+ +	—	+	—	+	—	+	—	+	+	g	+ +	+
III																
456	+ +	—	+	+ +	+			—	+	+	—	+	+	b	—	—
452	+ +	—	+	+ +	+			—	+	+	—	+	+	b	—	—
262	+ +	—	+	+ +	—			—	—	—	+	+	+	b	+ +	+
263	+ +	—	+	+ +	—			+	—	—	+	+	+	b	+ +	+
370	+ +	—	—	—	—			—	+	—	—	±	+	b	—	—
435	+ +	—	—	—	—			—	—	—	—	±	—	—	—	—
366	+ +	—	—	—	—			—	+	+	—	+	+	b	—	—
IV																
346	+ +	+ +	+	—	+			—	+	+	—	+	—	—	+ +	+
364	+ +	+ +	—	—	+			—	+	+	—	+	+	b	—	—
369	+ +	+ +	—	—	+			—	+	+	—	+	+	b	—	—
345	+ +	+ +	+	—	(+)			—	+	+	—	+	—	—	+ +	+
98	+ +	+ +	+	—	(+)			—	+	+	—	+	—	—	—	—

OVERZICHT VAN DE EIGENSCHA

(Verklarin

melk	Petr.	Endo	haem.	glyc.	zetm.	malt.	McC.	Levine	oorsprong
								B.	
2	r	rd+	—	++	—	+	2	coli	Tonistoma
2	r	rd++	+	++	—	+		ac. lact.	menschelijke faeces
11	rbr	wit	+	++	—	+	107	neap.	urine
1	r	rd+	—	++	—			cloacae?	Takslang
1	r	rd+	—	++	—			aer.	Ratelslang
1	r	rd++	+	++	—			aer.	Ophisaurus
1	r	rd++	+	—	—			aer.	id.
5	r	rd+	—	++	+		66	neap.	grachtwater
1	r	rd+	—	++	—		71	communior	id.
1	r	rd+	—	++	—		71	id.	Tonistoma
1	r	rd++	+	—	—		71	id.	Ophisaurus
2	r	wit	—	++	(+)			neap.	grachtwater
1	r	rd+	+	++	—		5	ac. lact.	vijverwater
1	r	rd++	—	++	—		34	coli	menschelijke faeces
1	r	rd	—	++	—		5	coli	urine
3	r	rd+	—	++	—		34	coli	menschelijke faeces
1	r	rd+	—	++	—			ac. lact.	Python
1	r	rd+	—	—	—		35	coli	Ratelslang
1	r	rd+	—	++	—		8	ac. latc.	vijverwater
1	r	rd+	—	++	—			coli	id.
1	r	rd+	—	++	—		7	coli	Kaaiman
2	r	rd+	—	—	—	+	106	communior	Slak
—	r	rd+	—	++	—	+	109	id.	Ophisaurus
5	r	rd+	—	++	—	+	68	neap.	vijverwater
2	r	rd+	d	++	—			communior	Slak
6	r	rd+	—	++	—			aer.	Tonistoma
3	r	rd++	—	++	—		102	aer.	grachtwater
12	r	wit	—	++	—	+			grachtwater
12	r	wit	—	++	—	+			id.
6	r	wit	—	—	—	+			id.
8	r	wit	—	—	—	+			id.
—	rb	wit	—	—	—	—			Ratelslang
—	rb	wit	—	+	—	+			Crocodil
—	b	wit	d	—	—	—			Python
20	r	wit	—	—	—	+			Tonistoma
—	rb	wit	—	—	—	+			Python
—	rb	wit	—	—	—	+			Waraan
30	r	wit	—	—	—	+			Tonistoma
13	rbr	wit	+	++	—	+			menschelijke faeces

PEN DER GEÏSOLEERDE STAMMEN.

ie volg. blz.).

VERKLARING DER TABEL.

Bij de vergisting der suikers, alkoholen, enz. duidt aan: + +: zuur- en gasvorming. +: alleen zuurvorming. —: zuur noch gasvorming. (dulcitol, adonitol, inuline en maltose zijn niet op gasvorming onderzocht).

Eijkm.:	(proef van Eijkman), + +: gasvorming. —: geen gasvorming.
V.P.:	(reactie van Voges-Proskauer), +: rood, —: niet rood.
gelatine:	+: vervloeiing na 21—36 dagen. —: geen vervloeiing.
M.R.:	+: rood. —: geel. ±: oranje.
citr. Kos:	(citraatproef volgens Koser), +: groei —: geen groei
citr. Simm.:	(citraatproef volgens Simmons), —: plaat groen. b: plaat blauw. g: plaat geel.
aesc.	:+: aesculineplaten bruin. —: onveranderd.
melk.:	het getal geeft aan, na hoeveel dagen de melk gestremd was. —: geen stremming.
Petr.:	(lakmoeswei volgens Petruschki), r: rood. b: blauw. rbr.: eerst rood, dan blauw, daarna wederom rood. rb: eerst rood, daarna blijvend blauw.
Endo:	wit: groei op Endoagar wit. rd: id. rood. rd+: id. en omgeving rood. rd++: id. met metaalglans.
haem.:	—: geen haemolyse. +: haem; d: haemodigestie.
Mcc.:	Stamnummer volgens McConkey.
Levine:	Benaming volgens Levine.

STELLINGEN.

I

Het uiteenwijken der glucose-, lactose- en Eijkmantiter bij voortgezette zelfreiniging van water wordt niet veroorzaakt door het overleven van bepaalde, meer resistente bacteriën.

II

De wijze, waarop de onderscheiding van het genus Escherichia in verschillende soorten in de tegenwoordige stelsels geschiedt, mist elken theoretischen grondslag.

III

Het is ongewenscht typische Salmonella's als paracoli te betitelen.

Bahr, J. of State Med. **37**, nr. 8, (1929).

IV

Bewegelijkheid zal nooit als fundamenteel verschilkenmerk bij de differentiatie van bacteriën in aanmerking mogen komen.

V

Er zijn geen voldoende gronden aanwezig, om kapselvormende bacteriën in een bepaalden tribus (Klebsielleae Trevisan) samen te vatten.

VI

De proeven van Druckrey bewijzen niet, dat Lactobacillus acidophilus en L. bulgaricus identiek zijn.

Drukrey, C. f. Bact. II **74**, 373, (1928).

VII

Door toevoeging van fenolen, kwikzouten e.d., zal de antiseptische werking van zeep niet verhoogd worden.

VIII

De verkoop van ongepasteuriseerden room dient verboden te worden.

IX

Voor de ontharding van ketelwater verdienen fosfaten in de meeste gevallen de voorkeur boven alle andere stoffen.

X

Aan het ammoniakwater der gas- en cokesfabrieken dienen de fenolen onttrokken te worden; actieve kool leent zich hiertoe het beste.

XI

De opvatting van OBERHAUSER en medewerkers over de activeering van oxaalzuur is onjuist.

OBERHAUSER, c. s. Ann. **470,** 111, (1929).
KRAUS, c. s. B. **63,** 568, (1930).

XII

De door RAIKOWA gegeven verklaring voor de isomerie der oximen is beter te aanvaarden dan die van HANTZSCH-WERNER, doch sluit de mogelijkheid van tautomerie niet uit.

RAIKOWA, B. **62,** 2142, (1929).
BUSCH en KÄMMERER, B. **63,** 649, (1930).

XIII

De opvatting van RASSOW en ZICKMANN, dat lignine met zoutzuur tot de vorming van een oxoniumzout aanleiding geeft, is door de experimenten onvoldoende gesteund.

RASSOW EN ZICKMANN, J. f. Pract. Ch. **123,** 189, (1929).

XIV

Het aanbrengen van roerwerken in de beluchtingsbekkens bij de biologische reiniging van afvalwater volgens het levend slib procédé, verdient aanbeveling.

XV

Over het algemeen moet men bij de afvalwaterzuivering aan de scheiding van bezink- en rotruimten de voorkeur geven boven de niet-gescheiden systemen (Emscherput e.d.).

XVI

Voor streken, waar gemeenten of industrieën een zelfde openbaar water verontreinigen, is de instelling van afvalwatergenootschappen als publiekrechtelijke lichamen noodzakelijk.

JUVAT
MAGNA
PETERE